

# Phosphoinositid 3-Kinase $\gamma$ (PI3K $\gamma$ ) als Mediator inflammatorischer Funktionen in Mikrogliazellen



---

seit 1558

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften

*„doctor rerum naturalium“*

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch - Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich - Schiller - Universität Jena

eingereicht von:

**M. Sc. Caroline Schmidt**

geboren am:

22. Februar 1983 in Pößneck

Die vorliegende Dissertation wurde am Universitätsklinikum Jena, Zentrum für Molekulare Biomedizin (CMB) im Institut für Molekulare Zellbiologie AG Prof. Dr. R. Wetzker angefertigt. Die Arbeit wird als kumulative Dissertation dem Rat der Biologisch - Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich - Schiller - Universität Jena vorgelegt. Grundlage sind vier Publikationen, bereits publiziert oder zur Veröffentlichung eingereicht.

## **Gutachter**

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Wetzker, Jena
2. Gutachter: PD Dr. Jörg P. Müller, Jena
3. Gutachter: Prof. Dr. Michael Schäfer, Leipzig

Disputation: 22.03.2016

## Kurzfassung

Mikrogliazellen werden als Makrophagen des Gehirns definiert. Während der fetalen Entwicklung wandern sie mit dem Blutstrom in das Gehirn ein und differenzieren zu adulten Zellen. Mikroglia unterscheiden sich von den im Körper zirkulierenden Makrophagen, zeigen jedoch ähnliche Reaktionsmuster und Oberflächenrezeptoren. Störungen der Homeostase im Gehirn können eine Aktivierung der Mikroglia induzieren, die eine Vielzahl zellulärer Schlüsselfunktionen einschließt. Aktivierte Mikroglia sind in der Lage, in geschädigte Regionen zu migrieren, mittels Phagozytose pathogene Mikroorganismen und nekrotische Neuronen zu eliminieren und Zytokine zu sezernieren. Die Aktivierung der Mikroglia kann zu regenerativen und degenerativen Prozessen im Gehirn beitragen.

Ein wichtiger Mediator immunologischer und inflammatorischer Reaktionen ist Phosphoinositid 3-Kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ). Das Signalprotein generiert über seine Lipidkinasefunktion Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>), welches als Botenstoff immunologische Schlüsselfunktionen steuert. Unabhängig von dieser enzymatischen Aktivität fungiert PI3K $\gamma$  zusätzlich als Gerüstprotein, welches mit anderen Proteinen Komplexe bilden kann. Untersuchungen der letzten Jahre belegen zunehmend regulatorische Funktionen von PI3K $\gamma$  außerhalb des Immunsystems. So konnte das Signalprotein in Zellen des zentralen Nervensystems, wie Neuronen und Mikroglia nachgewiesen werden (Jin et al., 2010, König et al., 2010). Die regulatorischen Funktionen von PI3K $\gamma$  in diesen Zellen sind jedoch weitgehend unbekannt.

Die vorliegende Arbeit ist ein erster Beitrag zum Verständnis der Signalfunktion von PI3K $\gamma$  in Mikroglia *in vitro* und *in vivo*. Das Funktionsmuster des Signalproteins wurde in isolierten Mikrogliazellen und in Mausmodellen der Krankheitsbilder, septische Enzephalopathie und Schlaganfall, untersucht.

Die Aktivierung der Mikroglia wurde in *in vitro*-Untersuchungen durch Lipopolysaccharid (LPS) oder Adenosintriphosphat (ATP) induziert. Diese Substanzen imitieren bakterielle Infektionen oder Trauma. Zur Bestimmung der regulatorischen Funktionen von PI3K $\gamma$  wurden primäre Mikrogliazellen aus Wildtyp und PI3K $\gamma$ -defizienten (*knockout*-KO) Mäusen isoliert. Mikrogliazellen, die eine Lipidkinase-defekte Mutante (*knockin*-KD) von PI3K $\gamma$  exprimieren, wurden in die vergleichenden Analysen einbezogen.

Die Induktion einer Aktivierungsreaktion der Mikroglia durch die Entzündungsmediatoren LPS oder ATP führte zu einer deutlichen Änderung der Morphologie der Zellen. Depletion oder pharmakologische Hemmung von PI3K $\gamma$  bewirkte eine deutliche Inhibition der Phagozytoserate und Proliferation. Die Rolle der Lipidkinaseaktivität des Signalproteins wurde mit Hilfe der PI3K $\gamma$  *knockin* Mutante untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Phagozytose in Mikrogliazellen ein Lipidkinase-unabhängiger Prozess ist und über die Gerüstfunktion des Signalproteins gesteuert wird. Die Interaktion der PI3K $\gamma$  mit Phosphodiesterase 3B führt zur Hydrolyse von cAMP und damit zur Aufhebung eines bekannten Hemmeffekts dieses Botenstoffs auf die Phagozytosefunktion.

In weiteren bisher nicht veröffentlichten Experimenten an isolierten Mikroglia konnte eine Lipidkinase-abhängige Regulation der durch LPS oder ATP-induzierten Proliferation nachgewiesen werden. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) fungieren dabei als Botenstoffe. Niedrige Dosen von LPS oder ATP bewirken aktivierende Effekte auf die Proliferation der Mikrogliazellen, während hohe Dosen diese Zellfunktion hemmen. Dieser "hormetische" Effekt der beiden Entzündungsmediatoren, konnte in Wildtyp Mikroglia beobachtet werden und wird durch PI3K $\gamma$  reguliert.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die spezifischen Funktionen von PI3K $\gamma$  in Mausmodellen der septischen Enzephalopathie und des Schlaganfalls näher untersucht. Die Experimente identifizierten PI3K $\gamma$  als protektiven Mediator in der Pathogenese dieser Erkrankungen. Im Modell der septischen Enzephalopathie zeigte sich, dass PI3K $\gamma$  Lipidkinase-unabhängig über die Hemmung des cAMP-Spiegels die Aktivität der Matrixmetalloprotease 9 (MMP9) kontrolliert. Matrixmetalloproteasen sind proteolytische Enzyme, die zu Störungen der Blut-Hirn-Schranke (BBB) führen können. Auch im Schlaganfall-Modell zeigte sich eine protektive Wirkung des Signalproteins. In PI3K $\gamma$ -defizienten Mäusen wurde eine Vergrößerung des Infarktvolumens im Gehirn nachgewiesen.

Die genannten *in vitro* und *in vivo*-Untersuchungen belegen eine Schlüsselfunktion von PI3K $\gamma$  bei der Kontrolle von Mikrogliafunktionen. Wegen der großen Bedeutung von Mikrogliazellen in entzündlichen Erkrankungen des Nervensystems sind diese Befunde von deutlicher klinischer Relevanz.



## Abstract

Microglial cells represent the macrophages of the brain. During fetal development precursor cells invade into the brain and differentiate to adult microglia cells. Microglial cells differ from circulating macrophages, but they exhibit similar surface receptors and reaction patterns. Disturbances of the homeostasis in the brain lead to the activation of microglia and induction of various cellular key functions. Activated microglial cells are able to migrate into damaged regions, eliminate pathological microorganisms and necrotic neurons by phagocytosis and secrete pro- and anti-inflammatory cytokines. Activation of microglial cells could be a part of regenerative and degenerative processes in the brain.

An important mediator of immunological and inflammatory reactions is Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ). The signaling protein generates via its lipid kinase activity PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> as a *second messenger* which controls many immunological key functions. Independent of its enzymatic activity PI3K $\gamma$  acts as a *scaffold protein* which forms complexes with other proteins. Investigations in the last years occupy more and more a regulatory function of PI3K $\gamma$  outside of the immune system. Detection of the signaling protein in neuronal cells and microglial cells (Jin et al., 2010, König et al., 2010) assumes that it might be involved in many neurological disorders. Until now the regulatory function of PI3K $\gamma$  in these cells is largely unknown.

The present thesis is a first contribution to understand the signaling function of PI3K $\gamma$  in microglial cell *in vitro* and *in vivo*. Functional pattern of PI3K $\gamma$  was investigated on isolated microglia cells and mouse models of septic encephalopathy and stroke. Pharmacological and genetic inhibition of PI3K $\gamma$  was used to analyze the specific function of the signaling protein in these models.

For *in vitro* investigations the activation of the cells was induced by Lipopolysaccharide (LPS) and Adenosintriphosphate (ATP). These compounds mimic bacterial infection or trauma. To analyze the regulatory function of PI3K $\gamma$  primary microglia from wild type and PI3K $\gamma$ -deficient (*knockout*) mice were isolated. In addition microglial cells from transgenic mice, which lack the lipidkinase activity (*knockin*) of PI3K $\gamma$  were involved.

Treatment of microglia with inflammatory mediators LPS or ATP leads to a distinct morphology change and the induction of an activated state. Depletion or

pharmacological inhibition of PI3K $\gamma$  affects phagocytosis and proliferation of the cells. The role of lipidkinase activity of the signaling protein was investigated by using the PI3K $\gamma$ -*knockin* mutant. We could show, that the phagocytotic activity of microglial cells is controlled in a lipidkinase independent way via the *scaffold protein* function of PI3K $\gamma$ . Interaction of PI3K $\gamma$  with Phosphodiesterase 3B (PDE3B) promotes the hydrolysis of cAMP and the abolishment of a known inhibitory effect of this second messenger on the phagocytotic activity.

Additional unpublished investigations on primary microglia stimulated with LPS or ATP revealed a lipidkinase dependent regulation of proliferative capacities. Induction of ROS production after LPS/ATP describes its important function as second messenger. Low doses of LPS and ATP show a beneficial effect on proliferation of microglia, whereas high concentrations inhibit this cell function. The hormetic effect of both inflammatory mediators could be shown in wild type microglia controlled by PI3K $\gamma$ .

The second part of the thesis focuses on specific functions of PI3K $\gamma$  in mouse models of septic encephalopathy (SE) and stroke. Different investigations identified PI3K $\gamma$  as protective mediator in the pathogenesis of these diseases. The *in vivo* model of septic encephalopathy showed that inhibition of cAMP controls activation of matrixmetalloprotease 9 (MMP9) in a PI3K $\gamma$  lipidkinase independent function. MMP are proteolytic enzymes which can lead to blood brain barrier damage. In stroke model we could also show protective effects of the signaling protein. PI3K $\gamma$  deficient mice exhibit an increased infarct volume.

Our *in vitro* and *in vivo* investigations occupy a key function of PI3K $\gamma$  in the control of microglia functions. Because of the importance of microglia during inflammatory reactions within the nervous system our results seems to be of distinct medical relevance.

# Inhaltsverzeichnis

<b>KURZFASSUNG .....</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>III</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>V</b>
<b>TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Mikrogliazellen – Immunzellen des Zentralen Nervensystems (ZNS).....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Entwicklung, Differenzierung und Verteilung.....	1
1.1.2 Funktionen im fetalen Gehirn .....	4
1.1.3 Funktionen im adulten Gehirn .....	5
1.1.4 Aktivierungsphänotypen - M1 und M2 Mikroglia .....	8
<b>1.2 Phosphoinositid 3-Kinasen - Signalproteine zellulärer Schlüsselfunktionen ..</b>	<b>13</b>
1.2.1 Funktion der Klasse I <sub>B</sub> -PI3K $\gamma$ .....	15
1.2.2 PI3K $\gamma$ -Funktion im Immunsystem.....	16
1.2.3 PI3K $\gamma$ -Funktion in Mikrogliazellen .....	17
1.2.4 PI3K $\gamma$ als Mediator inflammatorischer Erkrankungen .....	18
<b>1.3 Hormetische Effekte auf Mikrogliazellen - "Die Dosis macht das Gift" .....</b>	<b>19</b>
<b>2 ZIELSTELLUNG .....</b>	<b>22</b>
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Manuskript I .....</b>	<b>26</b>
3.1.1 Zusammenfassung.....	26
3.1.2 Manuskript I .....	27
<b>3.2 Manuskript II .....</b>	<b>37</b>
3.2.1 Zusammenfassung.....	37
3.2.2 Manuskript II .....	38

<b>3.3 Manuskript III .....</b>	<b>50</b>
3.3.1 Zusammenfassung.....	50
3.3.2. Manuskript III .....	51
<b>3.4 Manuskript IV .....</b>	<b>61</b>
3.4.1 Zusammenfassung.....	61
3.4.2 Manuskript IV .....	62
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>67</b>
<b>4.1 Die Rolle der PI3K<math>\gamma</math> als Schlüsselprotein inflammatorischer Reaktionen in Mikrogliazellen.....</b>	<b>67</b>
4.1.1 PI3K $\gamma$ -abhängige Regulation der Phagozytose .....	68
4.1.2 PI3K $\gamma$ als Mediator der ROS-Produktion .....	71
4.1.3 PI3K $\gamma$ und ROS als Mediatoren der Proliferation .....	72
4.1.4 Hormetische Effekte.....	73
<b>4.2 Mikroglia und die Bedeutung der PI3K<math>\gamma</math> in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen .....</b>	<b>76</b>
4.2.1 Sepsis-induzierte Störungen der Blut-Hirn-Schranke (BBB) .....	76
4.2.2 Schlaganfall und Ischämie .....	77
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>81</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>83</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>94</b>
<b>CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>95</b>
<b>PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE .....</b>	<b>96</b>
<b>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>	<b>98</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A $\beta$	Amyloid- $\beta$ -Plaques
Abb.	Abbildung
AD	Alzheimers <i>disease</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BBB	<i>blood brain barrier</i> - Blut-Hirn-Schranke
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
C5a	<i>complement factor 5a</i>
CSF-1	<i>colony stimulating factor-1</i>
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphate
dsRNA	Ribonukleinsäure
DAMP	<i>damage associated pattern molecules</i>
DRG	Dorsale Hinterwurzelganglien
EAE	experimentelle Autoimmune-Enzephalomyelitis
EZM	Extrazelluläre Matrix
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GDNF	<i>glial derived neurotrophic factor</i>
HMGB-1	<i>high mobility group 1 protein</i>
HSP60	Hitzeschockprotein 60
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10
IL-13	Interleukin 13
IL-12p70	Interleukin 12p70
IFN $\gamma$	Interferon- $\gamma$
KD	PI3K $\gamma$ - <i>knockin (kinase dead)</i>
KO	PI3K $\gamma$ - <i>knockout</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LPA	Lipoteichonsäure
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MCAO	<i>middle cerebral artery occlusion</i> - Verschluss der mittleren cerebralen Arterie
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>
MEK	<i>mitogen activated protein kinase kinase</i>
MMP	Matrix Metalloprotease
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> - Haupthistokompatibilitätskomplex)

NAC	N-Acetylcystein (ROS-Inhibitor)
NADPH-oxidase	Nicotinamid Adenin Dinucleotidphosphat-Oxidase
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NK	Natürliche Killerzellen
NO	Nitritoxid
OGD	<u>O</u> xygen <u>G</u> lucose <u>D</u> eprivation - Sauerstoff-Glucose-Entzug
PAMP	<i>pathogen associated pattern molecules</i>
PDE	Phosphodiesterase
PDK1	Phosphoinositid-abhängige Kinase 1
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
PI3K $\gamma$	Phosphoinositid 3-Kinase $\gamma$
PI3P	Phosphatidylinositol 3-Phosphat
PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphoinositid-4,5-bisphosphat
PtdIns(4,5)P <sub>3</sub>	Phosphoinositid-3,4,5-trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB/Akt	Proteinkinase B
PKC $\alpha$	Protein Kinase C $\alpha$
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome10</i>
RA	Rheumatoide Arthritis
ROS	<u>r</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies - Reaktive Sauerstoffspezies
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
SAE	septische Enzephalopathie
SHIP	<i>SH2-domain containing phosphatase</i>
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
UDP	Uridindiphosphat
TLR	<u>T</u> oll- <u>l</u> ike <u>R</u> ezeptor
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> Ontogenetische Entwicklung von Mikrogliazellen.....	2
<b>Abbildung 2</b> Stadien der Mikrogliaaktivierung.....	9
<b>Abbildung 3</b> Aktivierung durch PAMPS und DAMPs.....	11
<b>Abbildung 4</b> Signalweg und Funktionen der Klasse I PI3-Kinasen.....	15
<b>Abbildung 5</b> Funktionen der PI3K $\gamma$ in Zellen des Immunsystems und des ZNS.....	18
<b>Abbildung 6</b> Modell zur Hormese.....	20
<b>Abbildung 7</b> PI3K $\gamma$ -Lipidkinase-unabhängige Regulation der Phagozytose in Mikrogliazellen.....	98
<b>Abbildung 8</b> Schematische Darstellung möglicher hormetischer Effekte von PI3K $\gamma$ .....	103
<b>Abbildung 9</b> Inflammatorischer Signalweg nach akuter Hirnschädigung durch Sauerstoff-Glucose-Entzug.....	108
<b>Abbildung 10</b> PI3K $\gamma$ steuert Lipidkinase-abhängig und -unabhängig Mikrogliafunktionen.....	110
 <b>Tabelle 1</b> Funktion und Morphologie fetaler und adulter Mikroglia im ZNS.....	8

# 1 EINLEITUNG

Das Zentralnervensystem (ZNS) dient zur Verarbeitung, Weiterleitung und Übersetzung sensorischer Signale in motorische Informationen, die an Muskeln und Gewebe übertragen werden. Die hierbei ablaufenden Reaktionen werden zellspezifisch gesteuert (1).

Innerhalb des ZNS erfolgt die Unterscheidung von zwei Zellarten: Neuronen und Gliazellen. Gliazellen erfüllen eine schützende und Homeostase-aufrechterhaltende Rolle innerhalb des Gehirns (Bascobert, 2005). Sie werden in Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia unterteilt. Sie unterscheiden sich deutlich in Morphologie und Funktion. Während Astrozyten für Aufnahme, Degradation und Sekretion von Neurotransmittern, Regulation der Osmolarität und den Aufbau der Blut-Hirn-Schranke (BBB) verantwortlich sind; spielen Oligodendrozyten eine wichtige Rolle in der Produktion von Myelin (McTigue and Tripathi, 2008, Seth and Koul, 2008). Mikrogliazellen gelten als Immunzellen des ZNS. Sie sind verantwortlich für die Überwachung und Strukturierung des neuronalen Umfelds im gesunden oder geschädigten Gehirn (Peters and Connor, 2014).

## 1.1 Mikrogliazellen – Immunzellen des Zentralen Nervensystems (ZNS)

### 1.1.1 Entwicklung, Differenzierung und Verteilung

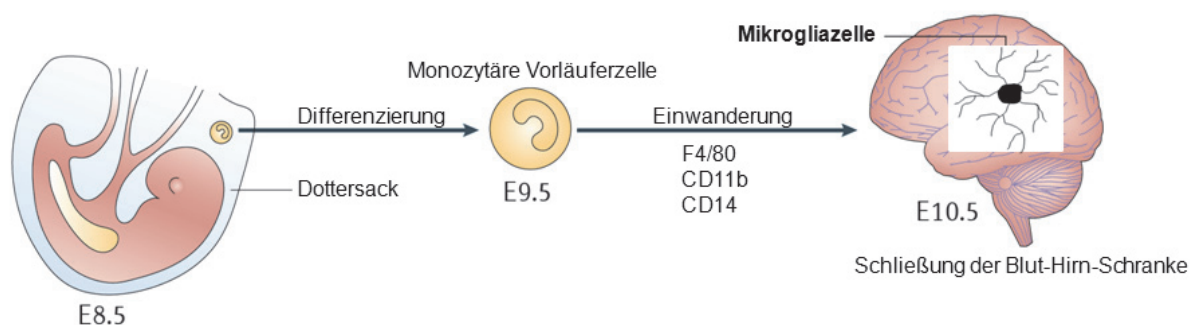
Aufgrund der Blut-Hirn-Schranke (BBB) ist das ZNS für mikrobielle oder andere invasive Krankheitserreger nicht zugänglich. Störungen der BBB können dazu führen, dass Pathogene eindringen und Infektionen auslösen. Die Elimination von Pathogenen erfolgt durch Mikrogliazellen, die auch als „Makrophagen des Gehirns“ bezeichnet werden. Sie sind fähig, Immunreaktionen zu induzieren und Krankheitserregern entgegen zu wirken (Kettenmann et al., 2011, Saijo and Glass, 2011, Dando et al., 2014). Als immunkompetente Zellen des Gehirns unterscheiden sie sich in Ursprung, Morphologie und Funktion von Astrozyten und Oligodendrozyten (Ransohoff and Perry, 2009, Kettenmann et al., 2011). Beide Zellarten sind neuroektodermaler Abstammung, wohingegen der exakte Ursprung der Mikrogliazellen bisher nicht eindeutig belegt werden konnte (Vilhardt, 2005).

Zum Einen wird die These unterstützt, dass Mikroglia von mesodermalen Zellen abstammen: Studien im embryonalen Gehirn von Mäusen zeigten, dass Vorläuferzellen im Dottersack, die später in mesenchymalem Gewebe auftreten, mit dem Neuroepithelium assoziieren, ins ZNS einwandern und dort zu Mikroglia



differenzieren (Kaur et al., 2001, Chan et al., 2007). Im Gegensatz dazu wurde auch gezeigt, dass Mikroglia durch primitive Haematopoese im Dottersack aus monozytären Vorläuferzellen entstehen. Diese werden passiv mit Hilfe des Blutstroms während der frühen Embryonalentwicklung ins ZNS transportiert. (Ginhoux et al., 2010, Schulz et al., 2012, Kierdorf and Prinz, 2013). Nach wie vor gibt es keine manifestierte wissenschaftliche Aussage über die Entstehung dieser makrophagenähnlichen Zellen. Im Allgemeinen erfolgt die Entwicklung und Differenzierung der Mikroglia während der frühen embryonalen und fetalen Entwicklung im Stadium E9,5-E10 (Abb. 1) (Saijo and Glass, 2011).

Erste Vorläuferzellen migrieren bereits vor der Bildung der BBB in das fetale Gehirn und haben hohe proliferative Eigenschaften (Ling and Wong, 1993, Saijo and Glass, 2011, Katsumoto et al., 2014). Als undifferenzierte Zellen migrieren sie über die Meningen in das Hirnparenchym ein oder gelangen über Ventrikel und Blutgefäße in definierte Gehirnareale. Während dieser frühen fetalen Gehirnentwicklung ist die BBB noch passierbar und erleichtert den Vorläufer-Mikroglia den Eintritt ins ZNS. Nach Erreichen ihres Zielortes verändern die amöboiden, fetalen Mikrogliazellen ihre Morphologie und werden allmählich zu ramifizierten, überwachenden Mikroglia (*surveying*). Nach Schließung der BBB ist die Einwanderung der Vorläufer-Mikroglia beendet (Abb. 1). Sie sind von den im Körper zirkulierenden Monozyten abgegrenzt und werden als eigene Makrophagenpopulation im ZNS definiert (Navascues et al., 2000, Vilhardt, 2005, Corraliza, 2014, Katsumoto et al., 2014).



**Abbildung 1 - Ontogenetische Entwicklung der Mikrogliazellen**

Monozytäre Vorläuferzellen migrieren während der fetalen Entwicklung aus dem Dottersack (*yolk sac*) zwischen E8,5 und E9,5 mit Hilfe des Blutstroms in das Gehirn ein. Differenzierung und Proliferation der Vorläuferzellen erfordert die Bildung von CSF-1 (*colony stimulating factor 1*). Nach der Einwanderung exprimieren sie makrophagen-typische Oberflächenmarker, wie F4/80, CD11b und CD14. Mit der Schließung der Blut-Hirn-Schranke an E10,5 liegen vollständig differenzierte Mikrogliazellen vor, die als eigenständige Makrophagenpopulation des Gehirns fungieren (Abbildung nach Saijo et al., 2011, modifiziert).

Der Nachweis charakteristischer Oberflächenrezeptoren (CD11b, CD14 und F4/80), welche auch makrophagen-assoziiert sind, zeigt die enge Verwandtschaft und begründet ihre Funktion als „Makrophagen des Gehirns“ (Kettenmann et al., 2011). Mikrogliazellen gelten als hochspezialisierte Zellen im ZNS, die in eine Vielzahl essentieller Prozesse zur Entwicklung des fetalen Gehirns steuern, aber auch postnatal zur Elimination von Pathogenen nach Infektion, Trauma oder neurodegenerativen Erkrankungen eine übergeordnete Rolle einnehmen (Streit and Xue, 2009).

Verteilung und Morphologie der Mikrogliazellen hängt von ihrer Lokalisation im Gehirn ab. Immunzytochemische Färbungen zeigten einen Anteil von 5% mikroglialer Zellen im *Cortex*, als auch im *Corpus Callosum*. Wohingegen die *Substantia Nigra* bis zu 12% aufwies. Unterschiede in Lokalisation und Zelldichte scheinen mit funktionellen Besonderheiten, u.a. der Expression verschiedener Rezeptoren zusammenzuhängen (Olah et al., 2011). Im Allgemeinen wird angenommen, dass Mikrogliazellen ca. 15% der Gesamtzellpopulation im Gehirn definieren und sie mit Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen ein dichtes Netzwerk bilden (Lawson et al., 1990). Sie gelten als wichtigste zelluläre Regulatoren der Immunantwort im Gehirn (Czeh et al., 2011) und können sich aufgrund ihres heterogenen Lebenszyklus an pathologische Schädigungsprozesse anpassen. Sie wirken als aktive Sensoren, die bei Veränderung oder Schädigung befähigt sind, Reaktionen zu induzieren, die die Homeostase im Hirnparenchym wiederherstellen (Hanisch and Kettenmann, 2007).

Während im embryonalen Gehirn Mikrogliazellen eine amoeboide Form zeigen, können sie im Adulten zwischen verschiedenen Aktivierungsstadien umschalten und sich somit an ihre Umgebung anpassen (Gomez-Nicola and Perry, 2014). Die ramifizierten, überwachenden Mikroglia zeichnen sich durch ihr kleines Zellsoma und die langen, verzweigten Ausläufer aus, welche kontinuierlich das neuronale Umfeld prüfen (Hanisch and Kettenmann, 2007, Catalin et al., 2013). Sobald Störungen im Hirnparenchym wahrgenommen werden, ändern die überwachenden Mikroglia ihre Morphologie und gehen in einen aktivierten Zustand über. Diese Aktivierung führt zum Anschalten verschiedener Verteidigungs- und Schutzmechanismen, zur Expression essentieller Oberflächenmoleküle und zur Bildung neurotropher, immunmodulatorischer Substanzen, wie BDNF, NGF und GDNF (Neumann et al., 2009, Gertig and Hanisch, 2014).

In den nächsten Abschnitten dieser Arbeit werden die unterschiedlichen morphologischen Phänotypen und explizite Funktionen im fetalen und adulten Gehirn näher beschrieben.

### 1.1.2 Funktionen im fetalen Gehirn

Die amoeboiden, naszenten Mikroglia kommen ubiquitär, im sich entwickelnden fetalen Gehirn vor und gelten als Vorläufer der ramifizierten Mikroglia (Rock et al., 2004) (Tab.1). Sie persistieren bis Entwicklungstag E14 als Einzelzellen oder Zellansammlungen in den Myelinbahnen der weißen Substanz. Diese Vorläufer-Mikroglia zeigen keine konstante Verteilung im Hirnparenchym und sind nur teilweise mit Neuronen oder Blutgefäßen assoziiert (Saijo and Glass, 2011). Amoeboide Mikroglia werden als multifunktionelle Immunzellen des sich entwickelnden ZNS beschrieben (Kaur et al., 2007). Sie besitzen die Eigenschaft Zellbruchstücke, die eine physiologische Entwicklung des ZNS hemmen würde, zu entfernen und nehmen eine makrophagen-assoziierte Funktion ein (Thomas, 1992, Ling and Wong, 1993). Damit fungieren sie als schützende Barriere gegen eindringende Pathogene. Bestätigt wurde diese essentielle Funktion durch den Nachweis hydrolytischer Enzyme (Esterasen), die Aktivierung von Oberflächenrezeptoren (ED1) und Antigenen (CR3, MHCII), welche auch in Makrophagen existieren (Stoll and Jander, 1999, Saijo and Glass, 2011).

Die phagozytotische Aktivität fetaler Mikroglia unterstützt den Ablauf natürlicher Degenerations- und Regenerationsprozesse während der Entwicklung des ZNS (Nakajima and Kohsaka, 2001) (Tab. 1). Innerhalb der Regulation zur Gehirnentwicklung und des Gedächtnisses spielen sie eine übergeordnete Rolle, indem sie aktiv synaptisches Material aufnehmen (*synaptic pruning*), um Integrität und Effizienz neuronaler Strukturen zu erhöhen und zu verbessern (Paolicelli et al., 2011). Amoeboide, fetale Mikroglia gelten außerdem als potentielle Promotoren für das Wachstum von Axonen, Nervenzellen und Gliazellen (Vilhardt, 2005). Mit zunehmender Entwicklung des Nervensystems und Schließung der BBB, erfolgt die Umwandlung der amoeboiden Mikroglia in die ramifizierte, überwachende Form (Ling and Wong, 1993, Hanisch and Kettenmann, 2007).

### 1.1.3 Funktionen im adulten Gehirn

Die Schließung der BBB führt zur Transformation amoeboider zu adulten, ramifizierten Mikrogliazellen, die sich in Morphologie und Funktion deutlich von fetalen Mikroglia unterscheiden. Sie bilden lange Ausläufer aus, um direkte Zell-Zell-Interaktionen mit Neuronen und anderen Gliazellen eingehen zu können und besitzen einen kleinen Zellkern, mit wenig Zytoplasma (Nimmerjahn et al., 2005, Hanisch and Kettenmann, 2007) (Tab. 1). Ramifizierte Mikroglia zeigen eine geringe, aber konstitutive Expression von Oberflächenmolekülen (MHCI und II, Fc-Rezeptoren) und eine niedrige Stoffwechselaktivität, was ihre verminderte migratorische, proliferative und phagozytotische Aktivität erklärt (Aloisi, 2001, Kettenmann et al., 2011) (Tab. 1). Daher wurden sie fälschlich als *“resting“* (ruhende) Zellen bezeichnet. Entgegen dieser Annahme, handelt es sich jedoch um höchstensible, konstitutiv-aktive Zellen, die mit Hilfe ihrer langen Ausläufer das neuronale Umfeld abtasten und auf Störungen der Homeostase, Infektionen, akute oder chronische Schädigungen direkt reagieren. Daher werden sie als *„Surveying“* – „überwachende Mikroglia“ definiert und nehmen eine *housekeeping* Funktion im ZNS ein (Hanisch and Kettenmann, 2007, Eggen et al., 2013, Nayak et al., 2014).

Unter nicht-pathologischen Bedingungen konnte im Mausmodell bewiesen werden, dass die Fortsätze überwachender, mikroglialer Zellen kontinuierlich in Bewegung sind und in engem Kontakt mit dem neuronalen Umfeld stehen (Nimmerjahn et al., 2005). Diese Beobachtungen zeigten, dass die Verzweigungen der Zellen möglicherweise, die sich am schnellsten bewegend, zellulären Strukturen überhaupt sind. Mit einer Geschwindigkeit von 1-3  $\mu\text{m}/\text{min}$  können sie verlängert oder wieder verkürzt werden, was die Motilität der Mikroglia im gesunden, intakten Gehirn beweist und die Aussage einer ruhender Zelle widerlegt (Davalos et al., 2005). Die Regulation erfolgt über die GABA- oder Glutamat- abhängige Mechanismen, die von Neuronen induziert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Motilität über purinerge Signalkaskaden mittels ATP gesteuert wird. ATP wird abhängig vom Ausmaß der Schädigung, von Neuronen freigesetzt und wirkt konzentrationsabhängig auf die Beweglichkeit der Mikroglia-Ausläufer. Niedrige extrazelluläre Konzentrationen führen zu verminderter Beweglichkeit, wohingegen hohe Konzentrationen eine erhöhte Motilität induzieren können (Davalos et al., 2005).

Unter pathologischen Konditionen registrieren *surveying* Mikroglia über zahlreiche Oberflächenrezeptoren (PRR) minimale Störungen als "Gefahren-Signale" im neuronalen Umfeld. Sobald die Homeostase außer Balance ist, induzieren sie einen Aktivierungsprozess. Dieser geht mit einer dramatischen morphologischen Veränderung, genetischen Umbauvorgängen, als auch der Induktion der adaptiven Immunantwort einher (Streit, 2002, Nimmerjahn et al., 2005, Vilhardt, 2005). Die Migration zum Infektionsherd, als auch eine induzierte Proliferation (*microgliosis*), Phagozytose und der Anstieg inflammatorischer Mediatoren (Zytokine, Chemokine) charakterisieren aktivierte Mikroglia. Zusätzlich exprimieren sie eine Vielzahl essentieller Oberflächenmoleküle, wie CD11b, CD14, MHC, Toll-like Rezeptoren (TLR) sowie Chemokin- und Zytokinrezeptoren (Rock et al., 2004, Takeuchi, 2010) (Tab 1).

Morphologisch zeichnen sie sich durch kurze, verdickte Ausläufer und eine deutlich abgerundete Form aus (Nakajima and Kohsaka, 2001). Ihre Funktionalität wird durch physiologischen Kontakt mit geschädigten Neuronen oder deren Sekretion von Neurotransmittern, Peptiden oder Wachstumsfaktoren wie GABA, Glutamat, Catecholaminen oder Fraktalkinen induziert, die an Rezeptoren der Mikroglia binden und zur Aktivierung führen (Bessis et al., 2007). Im aktivierten Zustand regulieren sie u. a. die zelluläre Homeostase, das Überleben von Neuronen und aktivieren über TLR die angeborene Immunantwort (Streit, 2002, Jack et al., 2005).

Zusätzlich zum *synaptic pruning*, welches während der Embryonalentwicklung beschrieben wird, können aktivierte, adulte Mikroglia dysfunktionelle Synapsen im Ganzen entfernen (*synaptic stripping*). Auch die Sekretion neurotropher Faktoren, wie NGF und BDNF, führt hierbei zusätzlich zur Regeneration neuronaler Strukturen. Dieser als Synaptogenese bezeichnete Vorgang, gilt als Grundlage für die lebenslange Plastizität des Gehirns (Bessis et al., 2007). Beweise für die essentielle Funktion von Mikroglia-produziertem BDNF in Lernprozessen und der Ausbildung des Gedächtnisses zeigte die Arbeit von Parkhurst et al. Ihre *in vivo* Experimente belegten, dass die Depletion von Mikrogliazellen im adulten Mäusegehirn zu reduzierter BDNF-Produktion führt und diese Mäuse Defizite im Lernen, als auch in ihren motorischen Fähigkeiten aufwiesen (Parkhurst et al., 2013).

Andere Arbeiten zeigten außerdem, dass aktivierte mikrogliale Zellen eine übergeordnete Funktion in der Neurogenese im adulten Gehirn einnehmen. In Verbindung mit T-Lymphozyten unterstützen sie die Proliferation neuronaler Stammzellen und damit die Bildung neuer Nervenzellen innerhalb der

hippocampalen Neurogenese. Diese ist zusätzlich eng verknüpft mit der Steuerung von Lernprozessen (Ziv et al., 2006).

Die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine durch aktivierte Mikroglia dient zusätzlich zur Wundheilung, der Wiederherstellung von Gewebe und der Regeneration von Neuronen im adulten Gehirn (Nakajima and Kohsaka, 2001, Boche et al., 2013).

Pathologische Ereignisse im ZNS führen zur Morphologieänderung mikroglialer Zellen und zur Induktion Makrophagen-assoziiierter Funktionen, wie Migration, Proliferation, Phagozytose und Zytokinsekretion. Durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$ ) werden T-Lymphozyten aktiviert, die in geschädigte Gehirn-Regionen einwandern. Mikroglia fungieren hierbei als Antigen-präsentierende- und Effektorzellen, indem sie mit invasiven Immunzellen eine Immunantwort und somit die Vernichtung von Pathogenen induzieren (Kettenmann, 2006; Takeuchi et al., 2010). Durch Elimination abgestorbener Zellen, Zelldebris und Geweberesten wird die Expansion einer Verletzung durch toxische Substanzen, die von nekrotischen Zellen abgesondert werden, unterbunden (Witting et al., 2000).


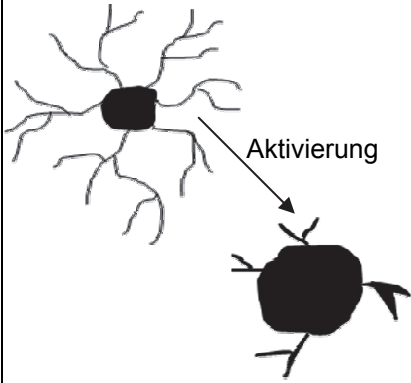
Adulte Mikroglia regulieren die Umschaltung von Ramifizierung und Aktivierung durch unterschiedliche Signale:

Zum einen durch sogenannte „Off“-Signale, die konstitutiv von Neuronen ausgesendet werden, um Mikroglia im überwachenden Zustand zu belassen und damit ihre proinflammatorische, degenerative Aktivität zu inhibieren. Zum anderen durch „On“-Signale, welche nach neuronaler Schädigung entstehen und zur Induktion des Aktivierungsprozesses mikroglialer Zellen führen (Biber et al., 2007). Im adulten Gehirn ist die Intensität der Aktivierung und die Balance zwischen „On“- und „Off“-Signalen ein essentieller Aspekt für protektive oder degenerative Mikroglia-Funktionen (Fernandes et al., 2014).

Die Eigenschaft, direkt auf externe Veränderungen im neuronalen Umfeld reagieren zu können, charakterisiert Mikrogliazellen als wichtigste immunkompetente Zellen im ZNS (Garden and Möller, 2006).

In Tabelle 1 sind Morphologie und Funktionen fetaler und adulter Mikroglia schematisch dargestellt.

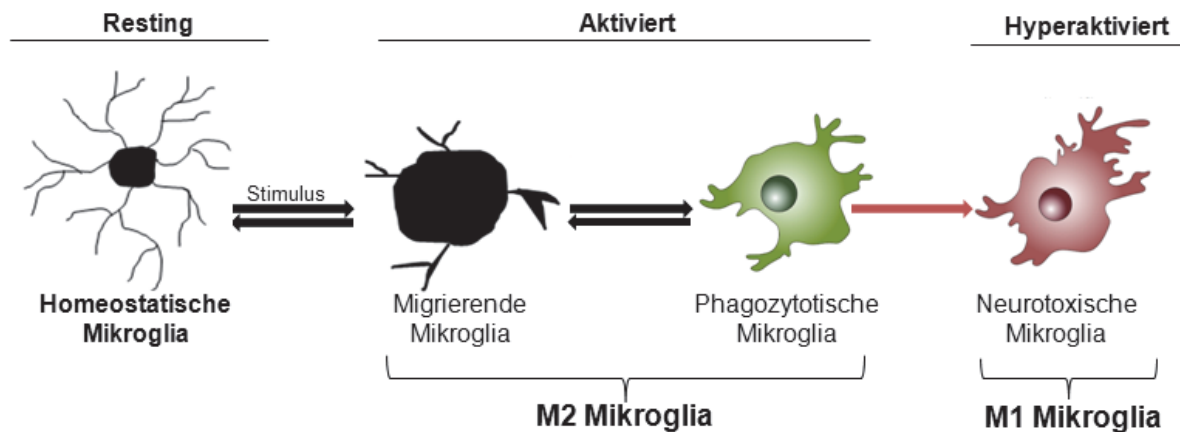
Tab 1. - Funktion und Morphologie fetaler und adulter Mikroglia im ZNS

	Morphologie	Funktion
<b>Fetale Mikroglia</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modifikation synaptischer Strukturen (<i>synaptic pruning</i>)</li> <li>• Phagozytose geschädigter Neuronen</li> <li>• Regulation der Entwicklung von Axonen und des Wachstums anderer Gliazellen</li> </ul>
<b>Adulte Mikroglia</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sekretion neurotropher Faktoren und Zytokine</li> <li>• Regeneration neuronaler Strukturen (<i>synaptic stripping</i>)</li> <li>• Proliferation</li> <li>• Phagozytose</li> <li>• Aufrechterhaltung der Homeostase im Gehirn</li> </ul>

#### 1.1.4 Aktivierungsphänotypen - M1 und M2 Mikroglia

Die Aktivierung mikroglialer Zellen ist entgegen früherer Annahmen kein "Alles oder Nichts"-Prozess, sondern untergliedert sich in verschiedene funktionelle Stadien (Block et al., 2007, Hanisch and Kettenmann, 2007, Giunti et al., 2014).

Innerhalb einer Mikrogliapopulation, welche im selben Gewebe lokalisiert ist, konnten Fernandes *et al.* unterschiedliche Aktivierungsphänotypen nachweisen. Der alternative anti-inflammatorische Phänotyp (M2) und der klassische pro-inflammatorische, neurotoxische Phänotyp (M1) (Abb. 2). Diese gegensätzlichen Aktivierungsstadien wurden anfangs für periphere Makrophagen definiert, die unter *in vitro*-Konditionen mit unterschiedlichen Substanzen behandelt wurden. Auch Mikrogliazellen zeigten nach Aktivierung verschiedene Phänotypen und damit verbundene Funktionsänderungen (Fernandes et al., 2014).



**Abbildung 2 - Stadien der Mikrogliaaktivierung**

Im gesunden, nicht geschädigten Gehirn zeigen Mikroglia eine "Überwachungsfunktion". Nach Detektion von Störungen im ZNS unterziehen sie sich einer Morphologieänderung. Diese zeigt sich in einem anti-inflammatorischen M2-Stadium, welches durch Migration und Phagozytose charakterisiert ist. Das pro-inflammatorische M1-Stadium zeigt hyperaktivierte Mikroglia, welche zu neurodegenerativen Prozessen im ZNS führen können (modifiziert nach Garden and Möller, 2006).

Der alternative M2-Phänotyp wird durch akute neurodegenerative Erkrankungen, wie Trauma, Hypoxie und Schlaganfall induziert und übt eine protektive Wirkung aus. Neben der Aufrechterhaltung der ZNS-Homeostase, durch Produktion neurotropher Faktoren (BDNF, GDNF, NGF) und anti-inflammatorischer Zytokine (IL-13, IL-4), schließt der M2-Phänotyp auch effiziente Phagozytose-Vorgänge ein (Giunti et al., 2014). Nach Schädigung werden Mikrogliazellen aktiviert und rekrutieren Th2-Lymphozyten in pathologisch-veränderte Regionen. *In vivo* Experimente zeigten, dass diese aktivierten Mikrogliazellen und Lymphozyten die Sekretion von IL-4 und IL-13 induzieren, die anti-inflammatorisch, also entzündungshemmend wirken (Freilich et al., 2013). Auch *in vitro* Experimente mit LPS- oder TNF- $\alpha$ -aktivierten-Mikroglia bewiesen die protektive Wirkung von IL-4. Toxische Effekte auf Neuronen, welche durch ROS oder pro-inflammatorische Zytokine (TNF- $\alpha$ ) ausgelöst werden, konnten durch IL-4 inhibiert werden (Zhao et al., 2006). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass über den CD36-scavenger-receptor  $\beta$ -Amyloid Oligomere, durch IL-4-induzierte Phagozytose eliminiert werden können (Shimizu et al., 2008).

Chronisch inflammatorische Prozesse können zur Aktivierung des M1-Phänotyps führen, welcher mit der Bildung pro-inflammatorischer Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 und anderer Mediatoren einhergeht (Fernandes et al., 2014). Die langanhaltende, dauerhafte Aktivierung der Mikroglia durch ansteigende Expression der NADPH-Oxidase und damit verbundener übermäßiger Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und oxidativem Stress kann zu degenerativen Prozessen innerhalb des ZNS führen (Vilhardt, 2005, Giunti et al., 2014). Auch andere



zytotoxische Substanzen, wie Superoxid und Stickstoffmonoxid werden nach Überaktivierung mikroglialer Zellen in sehr hohen Konzentrationen produziert und schädigen neuronale Strukturen. (Colton and Gilbert, 1987, Moss and Bates, 2001, Liu et al., 2002).

Chronisch inflammatorische Krankheitsbilder wie Alzheimer, Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose und Multiple Sklerose führen zur Aktivierung der M1-Mikroglia *in vivo* (Block et al., 2007). Unter *in vitro* Bedingungen konnte die Induktion der M1-Mikroglia nach Behandlung mit LPS, TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$ ,  $\beta$ -Amyloid und nekrotischen Neuronen simuliert werden (Meda et al., 1995, Pais et al., 2008, Martinez et al., 2009, Maezawa et al., 2011).

Bezugnehmend auf degenerative Erkrankungen, zeigte sich jedoch, dass M1- und M2-Stadium gleichermaßen in ein und demselben Gewebe vorliegen kann. Abhängig vom Krankheitsverlauf sind Mikroglia befähigt, vom pro-inflammatorischen Stadium in ein anti-inflammatorisches, neuroprotektives Stadium umzuschalten. Im Falle der Demyelinisierung während Multipler Sklerose und der damit verbundenen Induktion schwerer chronischer Inflammation konnten Vogel *et al.* zeigen, dass sowohl M1- (CD40, CD86) und M2-Oberflächenproteine (CD163) in den Läsionen exprimiert wurden (Ponomarev et al., 2007, Vogel et al., 2013).

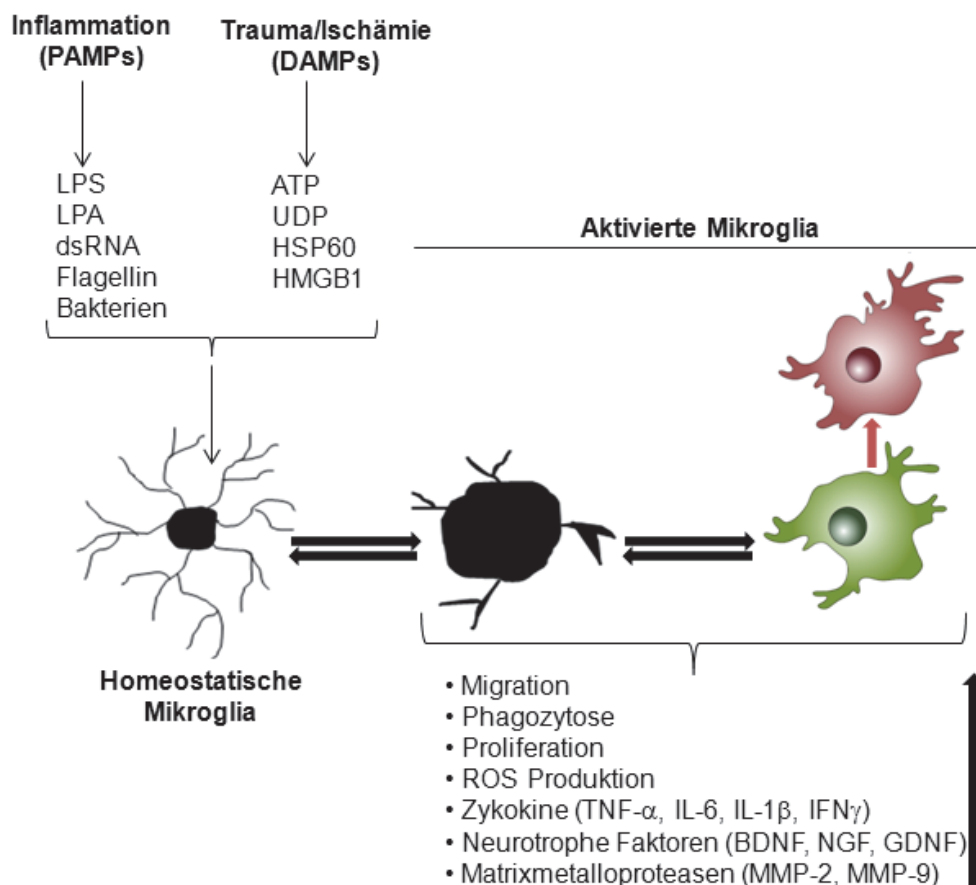
Einhergehend mit neuroinflammatorischen Erkrankungen, die zur Schädigung der BBB führen, kommt es zur Sekretion von Matrixmetalloproteasen (MMP). Speziell MMP-2 und MMP-9 werden durch aktivierte Mikroglia freigesetzt und schädigen in hohen Konzentrationen das Gewebe (Hu et al., 2014). Im gesunden Gehirn werden sie unter physiologischen Bedingungen in niedrigen Konzentrationen exprimiert und üben eine schützende Funktion aus (Narantuya et al., 2010). MMP sind spezielle Enzyme außerhalb der Extrazellulären Matrix (EZM), die am Umbau von Geweben beteiligt sind. Unter Anderem unterstützen sie die Migrationsfähigkeit zu degenerierten Regionen, sind an der Wundheilung oder der Angiogenese beteiligt (Rosenberg, 2002, Könnecke and Bechmann, 2013).

#### *Aktivierung der Mikrogliafunktionen nach Infektion (PAMPs) oder Trauma (DAMPs)*

Gewebeschädigung, zellulärer Stress oder Erkrankungen führen zur Bildung und Sekretion bestimmter Moleküle, die eine Immunreaktion auslösen. Dabei unterscheidet man Moleküle, die von eindringenden Pathogenen freigesetzt werden (PAMPs) und Moleküle, die endogen von geschädigten Zellen oder Geweben in das Zytoplasma sekretiert werden (DAMPs) (Kigerl et al., 2014).

Mikrogliazellen exprimieren sogenannte PRR (*pattern recognition receptors*), die als ein essentieller Teil der angeborenen Immunantwort dazu befähigt sind, eine

inflammatorische Reaktion zu induzieren. Mikrobielle Moleküle (PAMPs-*pathogen associated pattern molecules*), die von invasiven Bakterien oder Viren produziert werden, werden von PRR erkannt, lösen eine Aktivierung der Mikroglia aus und können Abwehrmechanismen induzieren. PRR erkennen außerdem geschädigte Proteine, aggregierte Peptide oder reagieren auf Trauma (Schlaganfall). Zusammengefasst werden diese Aktivatoren als DAMPs (*damage associated pattern molecules*) (Abb. 3). Die Induktion der Mikrogliaaktivierung und die Initiation einer Immunantwort nach PAMPs oder DAMPs, wird durch Toll-like Rezeptoren (TLR) gesteuert (Heneka et al., 2014). TLR1 bis TLR9 als auch ihre Co-Rezeptoren CD14 und CD47 konnten in Mikroglia nachgewiesen werden und ermöglichen über verschiedene Signalwege die Erkennung und Elimination von Pathogenen (Udan et al., 2008, Fellner et al., 2013).



**Abbildung 3 - Aktivierung durch PAMPs und DAMPs**

Die Aktivierung der Mikrogliazellen kann durch inflammatorische Substanzen, wie LPS oder durch Substanzen, die nach Trauma oder Ischämie freigesetzt werden erfolgen. Hierbei induzieren sie die Morphologieänderung, welche es ihnen ermöglicht, zu migrieren und Krankheitserreger durch Phagozytose zu eliminieren. Die Produktion von Zytokinen, ROS und neurotrophen Faktoren steigt an. Desweiteren sind sie befähigt zu proliferieren und Matrixmetalloproteasen zu aktivieren. (modifiziert nach Garden and Möller, 2006).

### *PAMPs - Lipopolysaccharid*

Eine Aktivierung von Mikrogliazellen durch LPS wurde bereits 1988 von Hetier *et al.* beschrieben (Hetier *et al.*, 1988). LPS ist ein Endotoxin aus der Zellwand gram-negativer Bakterien, welches als Inflammogen wirkt und sowohl *in vivo* als auch *in vitro* als typisches PAMP eingesetzt wird (Gao *et al.*, 2002). TLR4 und TLR2 gelten als wichtigste Rezeptoren der Mikroglia. TLR2 wird vorwiegend durch Zellwandkomponenten gram-positiver Bakterien aktiviert und spielt eine entscheidende Rolle in Mikrogliazellen nach Schlaganfall-induzierter Schädigung des Hirnparenchyms (Lehnardt *et al.*, 2007). TLR4 hingegen wird als LPS-bindender Rezeptor beschrieben, welcher nach Erkennung des Endotoxins eine Aktivierung in Form der Morphologieänderung der Mikroglia und eine damit verbundene Sekretion von Zytokinen und Stickstoffmonoxid induziert (Nakamura *et al.*, 1999). Es zeigte sich, dass LPS die meisten der Mikroglia-assoziierten Funktionen, wie ein Anstieg der Proliferationsrate, Induktion der Phagozytose und der Produktion von ROS und NO induziert (Rivest, 2003, Sun *et al.*, 2008, Kaneko *et al.*, 2009). Eine Aktivierung mikroglialer Zellen durch LPS führt ebenfalls zur Sekretion der Matrixmetalloproteasen MMP-2 und MMP-9, die abhängig von ihrer Konzentration eine duale Rolle während neuroinflammatorischer Prozesse einnehmen (Rosenberg, 2002).

### *DAMPs - Adenosintriphosphat und andere Purine*

Zur Fähigkeit der PPR auf PAMPs zu reagieren, können sie zusätzlich durch sogenannte "Gefahren-Signale" aktiviert werden. Neben Adenosintriphosphat (ATP) und Uridindiphosphat (UDP), welche durch geschädigte Neuronen freigesetzt werden, zählen auch  $\beta$ -Amyloide, ROS und verschiedene Hitzeschockproteine zu DAMPs (*damage associated pattern molecules*) (Abb.3). Nach Trauma, Ischämie, Schlaganfall und anderen mechanisch-induzierten Gehirnverletzungen, werden DAMPs durch apoptotische oder nekrotische Neuronen sezerniert und führen zur Aktivierung von Mikrogliazellen (Kigerl *et al.*, 2014). Der Aktivierungsprozess durch ATP wurde bereits 1993 von Kettenmann *et al.* in Zusammenhang mit elektrophysiologischen Experimenten beschrieben. Außerdem charakterisierten Inoue *et al.* ATP als Hauptaktivator für Mikrogliazellen, welcher P2Y- und P2X-Rezeptoren steuert. Zudem induziert der metabotrophe G-protein-gekoppelte P2Y-Rezeptor neben dem Aktivierungsmechanismus, auch die Proliferation und Zytokinproduktion von Mikrogliazellen (Kettenmann *et al.*, 1993, Inoue, 2006). Eine chemotaktische Reaktion und anschließende Migration konnte mittels ATP über

$G_i$ -gekoppelte P2Y-Rezeptoren nachgewiesen werden (Honda et al., 2001, Lambert et al., 2010). Neben der Aktivierung der Phagozytoseaktivität durch PAMPs konnte auch UDP, als DAMP, eine steigernde Phagozytose induzieren. Der P2Y Rezeptor wirkt hierbei als Sensor, der von Neuronen sekretiertes UTP, welches dann zu UDP degradiert wird, erkennt (Koizumi et al., 2007).

PAMPs und DAMPs induzieren über Rezeptoren eine Vielzahl essentieller Mikrogliafunktionen (Abb. 3), die zur Aktivierung des angeborenen, als auch des adaptiven Immunsystems führen und verschiedenste Signalkaskaden anschalten können (Parker et al., 2007).

## 1.2 Phosphoinositid 3-Kinasen - Signalproteine zellulärer Schlüsselfunktionen

Phosphoinositid 3-Kinasen (PI3K) sind Lipidkinasen, die ubiquitär in eukaryotischen Zellen exprimiert werden und die mittels ihrer enzymatischen Aktivität die Phosphorylierung der 3'-OH Gruppe membranständiger Inositolphospholipide katalysieren. Die entstandenen Produkte (3'-Phosphatidylinositole) spielen eine übergeordnete Rolle als Signalmolekül (*second messenger*) in einer Vielzahl zellulärer Schlüsselfunktionen. Vor allem Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) gilt als wichtiges *second messenger*-Molekül, da es als Andockstelle für weitere Proteine, wie Proteinkinase Akt und PDK1 dient. Auf diese Weise wird der PI3K/Akt Signalweg aktiviert, welcher neben der Kontrolle von Zellproliferation und -differenzierung, unter Anderem auch metabolische Prozesse, Adhäsion, Migration, Apoptose und Phagozytose steuert (Abb. 4). Speziell in der Entwicklung und Funktion von Immunzellen nehmen Phosphoinositid 3-Kinasen (PI3K) eine zentrale Rolle ein. Zudem gewinnen sie immer mehr an Bedeutung in der Pathogenese und Rekonvaleszenz verschiedener Erkrankungen (Wetzker and Rommel, 2004). Sämtliche PI3K bestehen aus einer katalytischen und regulatorischen Untereinheit. Während die katalytischen Untereinheiten Homologien in ihrer Lipidkinase-Domäne zeigen, unterscheiden sie sich jedoch stark in den regulatorischen Untereinheiten (Cantrell, 2001, Stephens and Hawkins, 2011, Okkenhaug, 2013).

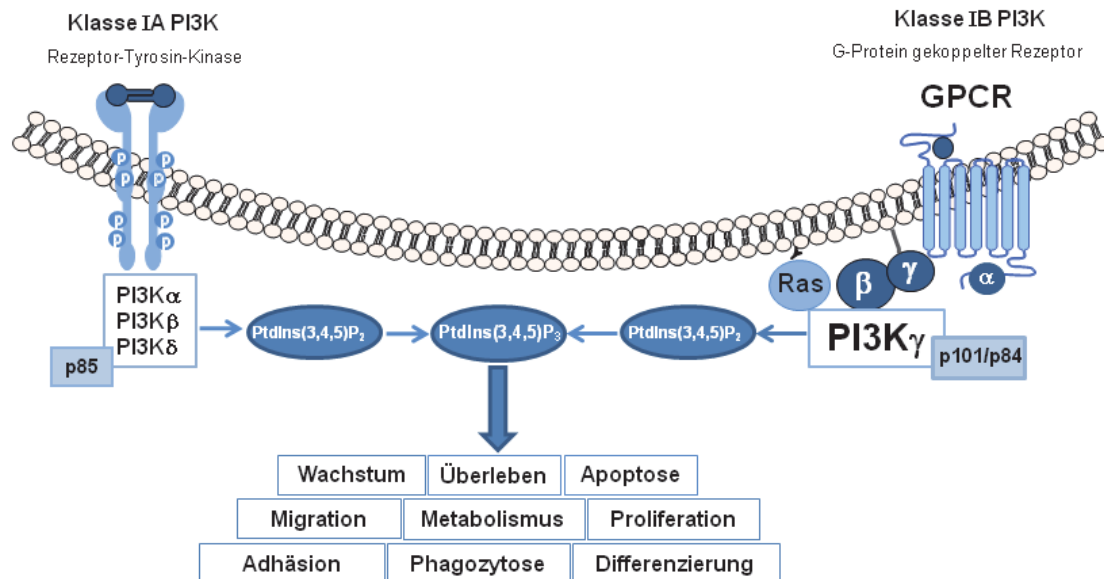
Klasse I PI3K sind heterodimere Proteine, die durch eine Vielzahl externer Stimuli aktiviert werden können (Coelho and Leever, 2000). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen werden sie nochmals in Klasse I<sub>A</sub> und I<sub>B</sub> unterteilt. Beide Subtypen setzen sich aus einer p110 katalytischen Untereinheit zusammen, von welcher vier Isoformen beschrieben werden: PI3K $\alpha$ , PI3K $\beta$ , PI3K $\gamma$ , PI3K $\delta$  (Abb. 4).

Der Klasse  $I_A$  werden  $PI3K\alpha$ ,  $PI3K\beta$ ,  $PI3K\delta$  zugeordnet, welche mit einer SH2-Domäne enthaltenden regulatorischen Adapter-Untereinheit ( $p85\alpha$ ,  $p85\beta$ ,  $p55\gamma$ ,  $p50\alpha$ ) assoziiert sind. Die Aktivierung der  $PI3K$  Klasse  $I_A$  erfolgt über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK). Die  $p85$ -Adapterproteine rekrutieren die katalytischen Untereinheiten  $p110\alpha$ ,  $p110\beta$  oder  $p110\delta$  zur aktivierten RTK. Die starke Interaktion zwischen  $p85$ -SH2-Domäne und spezifischen phosphorylierten Tyrosinen leitet die  $p110$  katalytische Untereinheit zur Plasmamembran, wo sie  $PtdIns(4,5)P_2$  zu  $PtdIns(4,5)P_3$  phosphoryliert (Cantley et al., 1991, Hawkins et al., 2006). Im Gegensatz dazu erfolgt die Aktivierung der Klasse  $I_B$   $PI3K$   $PI3K\gamma$  über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) (Stoyanov et al., 1995). Auch in Struktur und Größe der regulatorischen Untereinheiten unterscheidet sich  $PI3K\gamma$  von den Klasse  $I_A$   $PI3K$ . Zur Regulation wird die katalytische  $p110\gamma$  an  $p101$  oder  $p84$  gebunden (Stephens et al., 1997) (Abb. 4). Sobald ein Ligand den G-Protein-gekoppelten Rezeptor aktiviert, erfolgt die Dissoziation des heterotrimeren G-Proteins in  $G_\alpha$ - und  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit.  $G_{\beta\gamma}$  bindet die Adapter-Untereinheit ( $p101$  oder  $p84$ ), rekrutiert die katalytische Untereinheit  $p110\gamma$  an den Rezeptor oder wird direkt über Ras-GTP aktiviert (Suire et al., 2006, Rommel et al., 2007).

Trotz der Unterscheidung zwischen Rezeptor-Tyrosin-Kinase-gesteuerten und G-Protein-kontrollierten  $PI3K$ -Isoformen der Klasse I besitzen sie beide eine bevorzugte Substratspezifität für  $PtdIns(4,5)P_2$  (Abb. 4). Die Phosphorylierung von  $PtdIns(4,5)P_2$  zu  $PtdIns(3,4,5)P_3$ , welches durch die Lipidkinase-Aktivität katalysiert wird, stellt ein wesentliches Merkmal aller Klasse I  $PI3K$  dar (Wymann and Pirola, 1998).

Durch Lipophosphatasen kann die Phosphorylierung auch negativ reguliert werden. Als Gegenspieler der  $PI3K$  induziert PTEN die Dephosphorylierung von  $PtdIns(3,4,5)P_3$  zu  $PtdIns(4,5)P_2$ . Eine zweite Phosphatase (SHIP) generiert aus  $PtdIns(4,5)P_2$   $PtdIns(3,4)P$ , welches nicht durch  $PI3K$  phosphoryliert werden kann. Es kommt zur Hemmung des  $PI3K/Akt$  Signalweges, was zu unkontrolliertem Wachstum und zellulären Apoptosevorgängen führt (Paez and Sellers, 2003).

Im Fokus dieser Arbeit steht  $PI3K\gamma$ . Daher soll im nächsten Abschnitt auf ihre Funktionen detailliert eingegangen werden.



**Abbildung 4 - Signalweg und Funktionen der Klasse I PI3-Kinasen**

Die Klasse I PI3-Kinasen (PI3K) wird in I<sub>A</sub> und I<sub>B</sub> unterteilt. Die Aktivierung erfolgt über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Zur Klasse I<sub>A</sub> werden PI3K $\alpha$ , PI3K $\beta$  und PI3K $\delta$  zugeordnet. Deren katalytische Untereinheit p110 eine regulatorische p85 Untereinheit trägt. Klasse I<sub>B</sub>-PI3K wird durch PI3K $\gamma$  charakterisiert, welche über GPCR aktiviert wird. Die regulatorischen Untereinheiten p101 oder p84 rekrutieren die katalytische Untereinheit p110 $\gamma$  an den Rezeptor. Die Generation von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> zu PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> kennzeichnet beide Klasse I PI3K. Als *second messenger* steuert PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> eine Vielzahl zellulärer Funktionen.

### 1.2.1 Funktion der Klasse I<sub>B</sub> - PI3K $\gamma$

Während PI3K $\alpha$  und PI3K $\beta$  ubiquitär im Organismus exprimiert sind, können PI3K $\gamma$  und PI3K $\delta$  nur in spezifischen Zellen und Geweben nachgewiesen werden. Der *knockout* von PI3K $\alpha$  oder PI3K $\beta$  führt im Mausmodell bereits an Entwicklungstag E9,5 zur Letalität. Diese lebensnotwendige Funktion der beiden PI3K konnte mehrfach *in vivo* bestätigt werden (Bi et al., 1999, Bi et al., 2002). Im Gegensatz dazu ist die PI3K $\gamma$  *knockout* Maus lebensfähig, fertil und zeigt unter Ruhebedingungen keinen offensichtlichen Phänotyp (Hirsch et al., 2000).

Neben ihrer direkten Funktion als Lipidkinase zur Generation von PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, konnte für PI3K $\gamma$  zusätzlich eine sogenannte Gerüstfunktion (*scaffold function*) nachgewiesen werden. Patrucco et al. identifizierten eine direkte Protein-Protein-Interaktion von PI3K $\gamma$  mit Phosphodiesterase (PDE3B), welche die Hydrolyse von cAMP induziert (Patrucco et al., 2004). Eine Erniedrigung des cAMP-Spiegels führt über eine Hemmung der PKA-Phosphorylierung zu verringerter Kontraktilität des Herzens. Die Daten zeigten, dass PI3K $\gamma$  unabhängig von der Lipidkinase-Funktion mit anderen Proteinen interagiert und über diesen

Mechanismus die Herzmuskelfunktion kontrolliert. Sie übt damit eine wichtige Gerüstfunktion im Herzen aus (Patrucco et al., 2004, Perino et al., 2011).

Zusätzlich zur Funktion als Lipidkinase und als *scaffold protein*, besitzt PI3K $\gamma$  eine intrinsische Proteinkinase-Aktivität. Die Aktivierung von Ras und MEK über PI3K $\gamma$  induziert den MAPK-Signalweg, welcher die Proliferation zellulärer Systeme steuert. Protein- und Lipidkinase-Aktivität werden funktionell voneinander unterschieden (Bondeva et al., 1998, Bondev et al., 1999). In Neutrophilen Granulozyten wird der NADPH-Oxidase-Komplex, welcher zur Bildung von ROS aktiviert wird, über PKC $\alpha$  reguliert. Die Steuerung von PKC $\alpha$  erfolgt hierbei über die Proteinkinase-Aktivität von PI3K $\gamma$  (Lehmann et al., 2009).

### 1.2.2 PI3K $\gamma$ - Funktion im Immunsystem

Die dominante Expression in Zellen des Immunsystems identifiziert PI3K $\gamma$  als wichtigen Mediator inflammatorischer Prozesse. Eine Induktion adaptiver und angeborener Abwehrmechanismen, als auch die Kontrolle allergischer Reaktionen werden direkt über das Signalprotein gesteuert (Wymann et al., 2003). Pro-inflammatorische Eigenschaften von Immunzellen, wie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, die Regulation von Migration, Phagozytose und Apoptose, als auch metabolischer Prozesse, unterliegen PI3K $\gamma$ -abhängigen Kontrollmechanismen (Sasaki et al., 2000) (Abb. 5).

PI3K $\gamma$ -defiziente Neutrophile und Makrophagen zeigten durch inhibierte PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>-Produktion eine Reduktion in Motilität und ROS-Produktion (Hirsch et al., 2000). Die Depletion des Signalproteins führt zur direkten Hemmung chemotaktischer Bewegungen (Hirsch et al., 2000, Naccache et al., 2000, Wymann et al., 2003). PI3K $\gamma$ -defiziente Immunzellen und die dadurch resultierende Hemmung der PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>-Produktion, verhindert die Ausbildung des sogenannten Leitsaumes (*leading edge*), welcher für eine gerichtete Bewegung essentiell ist (Ferguson et al., 2007).

Eine gestörte Interaktion der PI3K $\gamma$  mit dem G-Protein Ras bewirkt eine Verringerung der ROS-Bildung in neutrophilen Granulozyten, welche für die Auslösung der Phagozytose-Aktivität eine große Rolle spielt (Suire et al., 2006). Die Induktion des *oxidative burst* in Phagozyten wird ebenfalls als wichtige Funktion von PI3K $\gamma$  beschrieben (Lehmann et al., 2009).

Die über den T-Zell-Rezeptor stimulierte PI3K $\gamma$  kontrolliert außerdem über Ras die Interaktion von T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen und führt zu einer Aktivierung dieser (Alcazar et al., 2007). Die Entwicklung von T-Zellen ist abhängig

von der funktionellen Kooperation von p110 $\gamma$  und p110 $\delta$ . Der *knockout* einer Isoform, führt zu reduzierter Proliferationsfähigkeit und einem drastischen Anstieg der Apoptoserate (Webb et al., 2005).

Desweiteren konnten Laffargue et al. zeigen, dass die Bildung von PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> durch PI3K $\gamma$  eine essentielle Funktion zur Degranulation von Mastzellen ausübt (Laffargue et al., 2002). Autokrine Signale, die zur Regulation von Allergien und der Freisetzung von Histaminen notwendig sind, werden nur über intakte G<sub>i</sub>-gekoppelte Rezeptoren induziert und führen abhängig von PI3K $\gamma$  zur Weiterleitung der Signale an Mastzellen und zur Aktivierung inflammatorischer Reaktionen (Laffargue et al., 2002).

### 1.2.3 PI3K $\gamma$ - Funktion in Mikrogliazellen

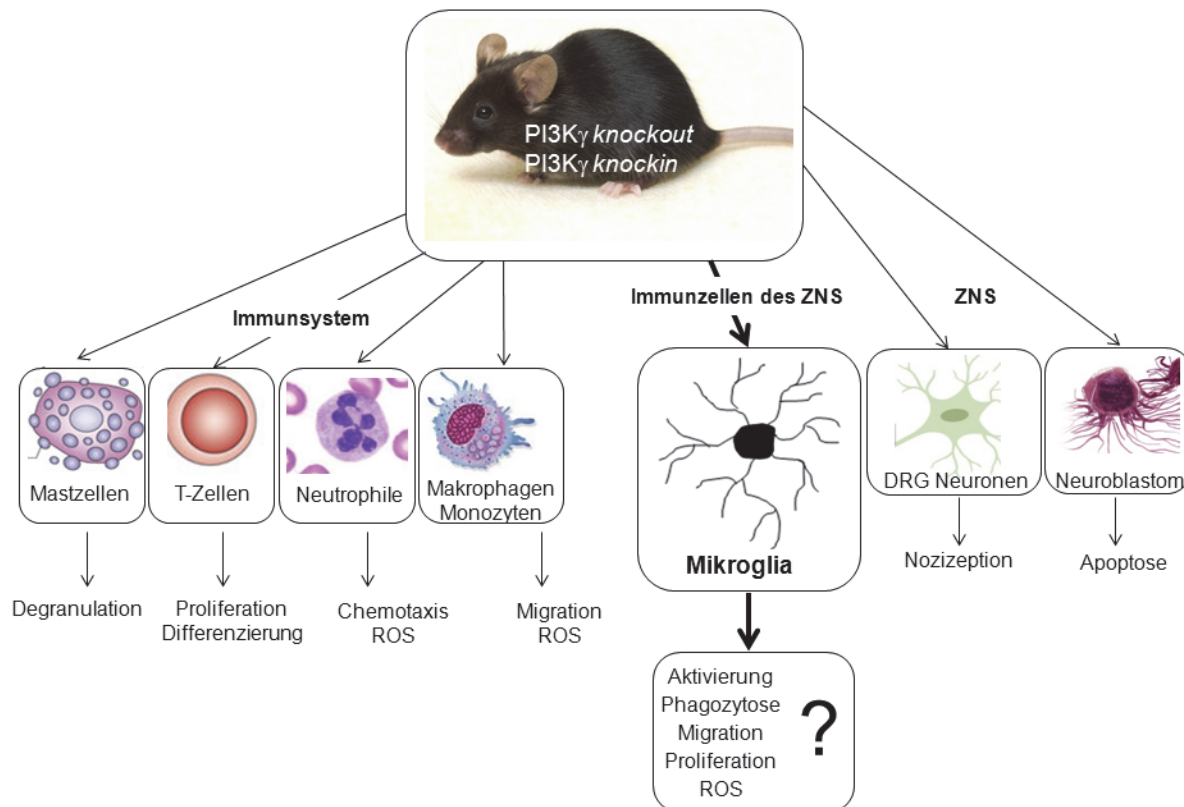
Als Immunzellen des Gehirns erfüllen Mikrogliazellen makrophagenähnliche Funktionen, die maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Homeostase im ZNS beteiligt sind (Kettenmann et al., 2011). Der Nachweis und die Funktion von PI3K $\gamma$  in Makrophagen und Monozyten lässt darauf schließen, dass das Signalprotein auch in Mikrogliazellen eine essentielle Funktion während immunologischer Prozesse einnimmt (Leverrier et al., 2003, Wymann and Solinas, 2013). Basierend auf vorangegangenen Studien zur Funktion von PI3K $\gamma$  in Immunzellen, entwickelte sich das Konzept der vorliegenden Dissertationsschrift.

Untersuchungen zum Expressionsmuster in Zellen des ZNS zeigten, dass PI3K $\gamma$  ausschließlich in Mikrogliazellen und neuronalen Zellen (DRGs) exprimiert wird (Jin et al., 2010, König et al., 2010) (Abb 5). Ein Nachweis des Proteins in Astrozyten und Oligodendrozyten konnte nicht erbracht werden (Jin et al., 2010).

Pathologische Ereignisse im ZNS führen zur Morphologieänderung und verbundener Aktivierung der Mikrogliazellen. Im aktivierten Zustand sind sie, ähnlich wie Makrophagen, fähig zur Migration, Phagozytose, Proliferation, ROS-Produktion und der Bildung verschiedener Zytokine (Hanisch and Kettenmann, 2007). Als phagozytotisch aktive Zellen nehmen Mikrogliazellen eine entscheidende Rolle während physiologischer und pathophysiologischer Prozesse ein (Kettenmann et al., 2011). Nach Akkumulation in geschädigten ZNS-Regionen eliminieren sie apoptotische Neuronen und unterstützen damit die Regeneration des Nervengewebes. Bakterielle Infektionen führen über TLR zur Aktivierung von Mikrogliazellen und induzieren die schnelle Elimination pathogener Mikroorganismen (Ribes et al., 2009). Membrangebundene Oberflächenmoleküle, wie TLR, Integrine und Fc-, Komplement- und Endotoxin-Rezeptoren erkennen extrazelluläre Liganden



als sogenannte „*eat-me*“-Signale und initiieren phagozytotische Vorgänge (Lauber et al., 2003, Brown and Neher, 2012). Speziell  $\text{Fc}\gamma$ -Rezeptoren induzieren die Phagozytose mikroglialer Zellen und Makrophagen u.a. über den PI3K-Signalweg (Makranz et al., 2006, Roy et al., 2014).



**Abbildung 5 - Funktionen der PI3K $\gamma$  in Zellen des Immunsystems und des ZNS**

Phosphoinositid 3-Kinase $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) wird dominant in Zellen des Immunsystems exprimiert und steuert essentielle immunologische Funktionen. Differenzierung, Proliferation, Chemotaxis und ROS-Produktion werden PI3K $\gamma$ -abhängig in T-Zellen, Neutrophilen und Makrophagen reguliert. Auch in Mikrogliazellen, die als Immunzellen des ZNS beschrieben werden, kontrolliert das Signalprotein inflammatorische Reaktionen. Gegenstand dieser Arbeit ist die Rolle von PI3K $\gamma$  in der Regulation verschiedener Mikrogliafunktionen zu untersuchen. Innerhalb des ZNS konnte bereits für DRG-Neuronen und im Neuroblastom eine PI3K $\gamma$ -abhängige Steuerung in Schmerzweiterleitung und Apoptose nachgewiesen werden (Spitzenberg et al., 2010, Madishetti et al., 2014) (2).

#### 1.2.4 PI3K $\gamma$ als Mediator inflammatorischer Erkrankungen

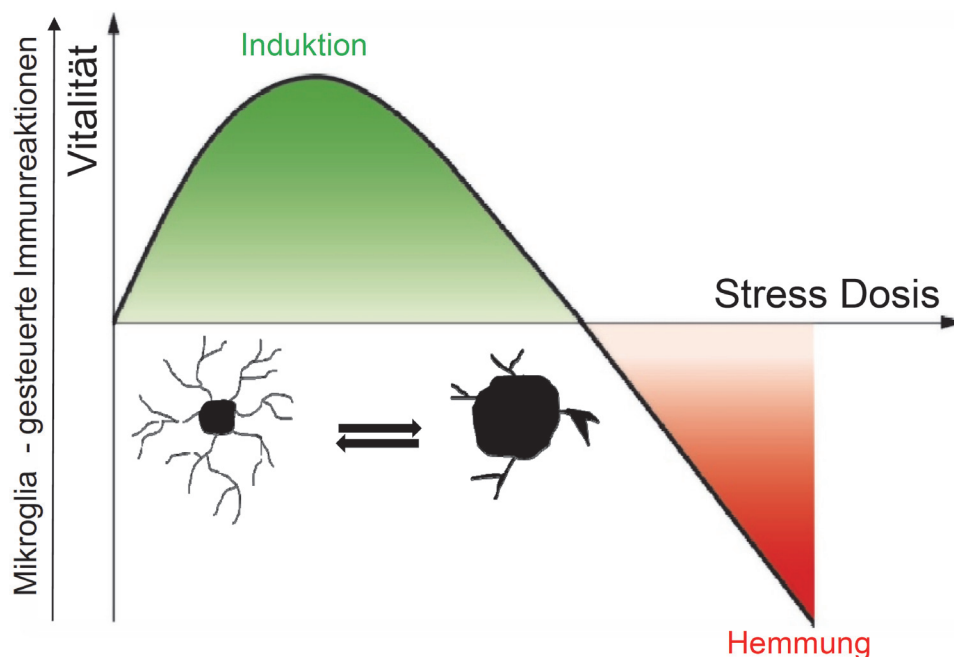
PI3K $\gamma$  spielt eine übergeordnete Rolle in einer Vielzahl inflammatorischer Erkrankungen. Im Krankheitsbild der antigen-induzierten Arthritis (AIA) führt die Hemmung der PI3K $\gamma$  zu verringerter Migration und Aktivierung von Phagozyten. Auch die Produktion von IL-1 $\beta$  und IL-6 war neben der Infiltration von Neutrophilen und Makrophagen drastisch reduziert. Ein Einfluss von PI3K $\gamma$  auf die T-Zell-Aktivierung konnte im AIA-Modell nicht nachgewiesen werden. Somit

bestätigte sich, dass PI3K $\gamma$  spezifisch die Phagozytenfunktionen steuert und damit zu einer reduzierten inflammatorischen Reaktion führt (Gruen et al., 2010). Desweiteren konnten Camps et al. durch PI3K $\gamma$ -Suppression die inflammatorische Reaktion während rheumatoider Arthritis (RA) hemmen. Im Mausmodell zeigte sich nach Behandlung der RA mit pharmakologischen PI3K $\gamma$ -Inhibitoren eine Reduktion der Entzündung im Gelenk, als auch eine Regeneration des umliegenden Gewebes. Diese Ergebnisse bestätigten sich auch in PI3K $\gamma$  *knockout* Tieren (Camps et al., 2005, Rommel et al., 2007).

Im Modell der Multiplen Sklerose (EAE-experimentelle Autoimmune-Enzephalomyelitis) zeigte sich, dass PI3K $\gamma$  maßgeblich an der Pathogenese dieser Erkrankung beteiligt ist. In PI3K $\gamma$ -defizienten Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass die Symptome der EAE verzögerter und abgeschwächer ablaufen, als in Wildtyp Tieren (Berod et al., 2011). PI3K $\gamma$  gilt als mögliches therapeutisches Ziel zur Behandlung chronisch inflammatorischer Erkrankungen.

### 1.3 Hormetische Effekte auf Mikrogliazellen - "Die Dosis macht das Gift"

Der Begriff "Hormese" beschreibt einen biphasischen Dosis-abhängigen Effekt, der in niedrigen Konzentrationen zu positiven zellulären Antworten führt und bei hohen Dosen einen inhibitorischen, toxischen Effekt zeigt. Bereits Paracelsus prägte den Satz: *Dosis sola venenum facit* - "Allein die Dosis macht das Gift". Sogenannte Stressoren, wie Toxine, Strahlung, ROS, Zytokine und andere inflammatorische Mediatoren induzieren eine Reaktion des Körpers oder bestimmter Zellsysteme. Dabei spielt die Dosis des Stressors eine wichtige Rolle. Niedrige Konzentrationen führen zu adaptiven Reaktionen, die sich positiv auf den Organismus auswirken und in gesteigerter Vitalität resultieren. Wohingegen zu hohe Dosen zu degenerativen Prozessen, bis hin zum Zelltod führen können (Calabrese et al., 2007). Die gegensätzliche Wirkung unterschiedlicher Stressoren konnte in Zellen des Immunsystems und organismischen Modellen nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass ROS in geringen Dosen eine lebensverlängernde und gesundheitsfördernde Wirkung haben. Durch geringe ROS-Konzentrationen werden adaptive Reaktionen, wie Abwehrmechanismen und Stress-Resistenz induziert, die einen positiven Effekt auf Vitalität und Überleben ausüben. In diversen Modellorganismen (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, Mausmutanten etc.) konnten diese Reaktionen bereits nachgewiesen werden (Ristow and Schmeisser, 2011).



**Abbildung 6 - Modell zur Hormese**

In Abhängigkeit von verschiedenen Stressoren induzieren zelluläre Systeme differentielle Reaktionen. Vitalität und Regeneration (grün), als auch Apoptose und Degeneration (rot) spielen vor allem während adaptiver Reaktionen in Zellen des Immunsystems eine essentielle Rolle. Hormetische Reaktionsmuster dienen zur Analyse dosisabhängiger Funktionen und der Ausbildung von Toleranz- und Resistenzreaktionen. (modifiziert nach Calabrese et al 2007)

Zellen des Immunsystems, die direkt auf Pathogene oder Schädigungen reagieren und Teil der angeborenen Immunantwort sind, prägen diese Art der Stress-Resistenz aus. Makrophagen und Mikroglia gelten als wichtigster Zelltyp innerhalb des Immunsystems, welche als erste aktiviert werden und an der Elimination von Krankheitserregern beteiligt sind (Town et al., 2005). Dosisabhängige, hormetische Effekte diverser Stressoren können sowohl auf Makrophagen, als auch auf Mikroglia projiziert werden. Die Aktivierung erfolgt mittels TLR4, der als LPS Rezeptor fungiert, PAMPs erkennt und zum Anschalten von Signalwegen führt.

Einen solchen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Proliferationsfähigkeit konnten Kaneko et al. in *in vitro* Studien zeigen. Mikroglia, die 4 Wochen mit niedrigen Dosen LPS behandelt wurden, zeigten eine höhere Proliferationsrate als Zellen, die nicht bzw. mit hohen Dosen LPS stimuliert wurden (Kaneko et al., 2009). Die "optimale" Dosis supprimiert Apoptose- und Autophagie-Signalwege, die die Überlebensrate der Zellen deutlich erhöhten (Kaneko et al., 2012).

Auch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies übt einen hormetischen Effekt auf Mikrogliazellen aus. Niedrige intrazelluläre Konzentrationen wirken als *second*

*messenger* positiv auf Überleben und induzieren pro-inflammatorische Reaktionen, die eine Vielzahl von Signalwegen und Transkriptionsfaktoren ansteuern. Im Gegensatz dazu führen hohe LPS Konzentrationen zu deutlich höherem ROS-Niveau, was wiederum Apoptose-Signalwege anschaltet und in degenerativen Prozessen resultiert (Block et al., 2007). Auch die Sekretion pro- und anti-inflammatorischer Zytokine wird durch LPS konzentrationsabhängig induziert (Qin et al., 2005). Je nach Dosis und dem damit verbundenen Aktivierungsstatus der Mikroglia, kommt es zur Freisetzung von IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Nakamura et al., 1999). Die phagozytotische Aktivität der Zellen scheint ebenfalls von der LPS-Konzentration abhängig zu sein. Adenosintriphosphat, als typisches DAMP, wirkt in hormetischen Dosen auf die Migrationsfähigkeit von Mikroglia und Makrophagen. Zu hohe Dosen führen zur Inhibition der Beweglichkeit, während niedrige Konzentrationen die Motilität der Zellen erhöhen (Lambert et al., 2010).

Hormetische Reaktionen von Mikrogliazellen werden *in vivo* als auch *in vitro* durch PAMPs und DAMPs induziert. Die Art der Adaptation an geringe Reize und die resultierende Aktivierung verschiedener Mikroglia-Funktionen scheinen eine wichtige Rolle während regenerativer oder degenerativer Prozesse im ZNS zu spielen. Nach bisherigem Kenntnisstand sind Regulation und Identität intrazellulärer Mediatoren innerhalb dieser Prozesse weitgehend ungeklärt. Gegenstand dieser Arbeit sollte daher sein, PI3K $\gamma$  als möglichen Mediator adaptiver Reaktionen in Mikrogliazellen zu beschreiben.

## 2 ZIELSTELLUNG

PI3K $\gamma$  gilt als wichtiger Mediator essentieller Immunreaktionen, die u.a. Migration, Phagozytose und die Induktion von Entzündungsprozessen einschließen. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass PI3K $\gamma$  in Zellen des Zentralen Nervensystems eine wichtige Rolle einnimmt (König et al., 2010, Spitzenberg et al., 2010). Erste Befunde deuten auch auf die Funktion von PI3K $\gamma$  im Krankheitsbild von Alzheimer und im Schlaganfall-Modell hin (Jin et al., 2010, Passos et al., 2010).

Speziell Mikrogliazellen, die als immunkompetente Zellen des Gehirns beschrieben werden, scheinen Immunreaktionen PI3K $\gamma$ -abhängig zu steuern. Als „Makrophagen des Gehirns“ reagieren sie auf Störungen der Blut-Hirn-Schranke, apoptotische Neuronen und invasive Pathogene. In diesem aktivierten Zustand sind sie zur Proliferation, Phagozytose, Migration fähig und nehmen eine wichtige Funktion während inflammatorischer Reaktionen des angeborenen Immunsystems im ZNS ein.

Basierend auf diesen Befunden soll die vorliegende Arbeit die Rolle von PI3K $\gamma$  in Mikrogliazellen näher charakterisieren. *In vivo* Studien an inflammatorischen Krankheitsmodellen sollen zudem zeigen, ob die Hemmung von PI3K $\gamma$  als therapeutischer Ansatz zur Rekonvaleszenz neurodegenerativer Erkrankungen beitragen kann.

### **Folgende Fragestellungen wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht:**

- Welche Funktionen übernimmt PI3K $\gamma$  in Mikrogliazellen und führt der Verlust von PI3K $\gamma$  zur Blockierung wichtiger Abwehrmechanismen?
- Werden Mikrogliafunktionen Lipidkinase-abhängig oder -unabhängig durch PI3K $\gamma$  gesteuert?
- Induzieren unterschiedliche Stressoren (LPS, ATP) adaptive Immunreaktionen nach hormetischem Muster?
- Welche Rolle spielt PI3K $\gamma$  während der septischen Enzephalopathie und im Schlaganfall-Modell?

### 3 ERGEBNISSE

Die vorliegende Dissertation wurde als kumulative Arbeit eingereicht. Grundlage dieser Arbeit sind vier Publikationen. Im Folgenden wird die Eigenleistung in Bezug auf Inhalt und Umfang prozentual dargelegt.

#### 3.1 Manuskript I

##### **Phosphoinositide 3-Kinase $\gamma$ Mediates Microglial Phagocytosis Via Lipid Kinase-Independent Control of cAMP**

C. Schmidt\*, N. Schneble\*, J.P. Müller, R. Bauer, A. Perino, R. Marone, S.D. Rybalkin, M.P. Wymann, E. Hirsch, R. Wetzker

*Neuroscience* 233 (2013) 44–53

##### **Eigenanteil 30%**

Die Konzeption des Projekts und Niederschrift des Manuskripts erfolgten durch N. Schneble, R. Wetzker und C. Schmidt. N. Schneble kreierte mittels *shRNA* Transfektion in BV-2 Zellen den *knockdown* für PI3K $\alpha\beta\gamma\delta$  und p84/p101. Proteinbiochemische und mikroskopische Analysen, sowie sämtliche FACS-Messungen primärer Mikrogliazellen und BV-2 Zellen wurden von mir durchgeführt. J. P. Müller stand bei technischen und experimentellen Fragen zur Seite. *In vivo* Experimente zur Phagozytose erfolgten durch R. Bauer. A. Perino und E. Hirsch stellten Antikörper für p84 und p101 für Westernblotanalysen zur Verfügung. R. Marone und M. P. Wymann kreierte die PI3K $\gamma$  *knockin* Mausmutante. S. D. Rybalkin stellte den PDE3B Antikörper für IP-Analysen zur Verfügung.

\* gleichberechtigte Erstautoren

### 3.2 Manuskript II

#### **Phosphoinositide 3-kinase $\gamma$ restrains neurotoxic effects of microglia after transitory focal cerebral ischemia**

Caroline Schmidt, Christiane Frahm, Nadine Schneble, Jörg P. Müller, Michael Brodhun, Irene Franco, Otto W. Witte, Emilio Hirsch, Reinhard Wetzker, Reinhard Bauer

*Molecular Neurobiology*

(DOI 10.1007/s12035-015-9472-z2015, accepted 1 October 2015)

#### **Eigenanteil 30%**

Die Konzeption und Planung des Projekts, die Niederschrift und Bearbeitung der Abbildungen erfolgten durch R. Bauer und C. Schmidt. Die Isolation und Kultivierung primärer Mikrogliazellen und damit verbundene Stimulationsexperimente, Westernblotanalysen, MMP-Nachweis mittels Zymografie und die Quantifizierung dieser, sowie cAMP-Messungen und Phagozytose Analysen via FACS wurden von mir durchgeführt. R. Bauer plante und führte die *in vivo* Experimente durch. Die Gehirnschnitte und Fluoreszenzfärbungen erfolgten durch R.M. Zimmer.

### 3.3 Manuskript III

#### **Phosphoinositide 3-Kinase $\gamma$ Affects LPS-induced Disturbance of Blood-Brain Barrier Via Lipid Kinase-Independent Control of cAMP in Microglial Cells**

A. Frister\*, C. Schmidt\*, N. Schneble, M. Brodhun, F. A. Gonnert, M. Bauer, E. Hirsch, J.P. Müller, R. Wetzker, R. Bauer

*Neuromolecular Medicine* (2014) ISSN 1535-1084 16(4):704-13

#### **Eigenanteil 30%**

Die Konzeption und Planung des Projekts, die Niederschrift und Bearbeitung der Abbildungen erfolgten durch R. Bauer R. Wetzker, A. Frister und C. Schmidt. A. Frister führte die *in vivo* Experimente durch, analysierte die Gehirnschnitte und Fluoreszenzfärbungen. Die Kultivierung der BV-2 Zellen, RNA-Isolation sowie die Durchführung der qRT-PCR erfolgten in Zusammenarbeit mit N. Schneble. Die Isolation und Kultivierung primärer Mikrogliazellen wurden von mir durchgeführt. Stimulationsexperimente, Westernblotanalysen, MMP-Nachweis mittels Zymografie und die Quantifizierung dieser erfolgten ebenfalls durch mich. Teile dieser Publikation wurden in der Dissertation von A. Frister bereits niedergeschrieben.

\* gleichberechtigte Erstautoren

### **3.4 Manuskript IV**

#### **The fifth dimension of innate immunity**

C. Schmidt, N. Schneble, R. Wetzker

*Journal of Cell Communication and Signaling* (2014) ISSN 1873-9601

#### **Eigenanteil 30%**

Das Konzept und die Niederschrift des Artikels übernahm R. Wetzker. Zuarbeiten zur Literatur, Bearbeitung der Abbildungen und Beschriftungen erfolgten in Zusammenarbeit mit N. Schneble. Dosisabhängige Versuche an primären Mikrogliazellen, Messung der Phagozytose via FACS und Proliferations-Assays wurden von mir durchgeführt.



### 3.1 Manuskript I

#### 3.1.1 Zusammenfassung

##### **PHOSPHOINOSITIDE 3-KINASE $\gamma$ MEDIATES MICROGLIAL PHAGOCYTOSIS VIA LIPID KINASE-INDEPENDENT CONTROL OF cAMP**

C. Schmidt\*, N. Schneble\*, J.P. Müller, R. Bauer, A. Perino, R. Marone, S.D. Rybalkin, M.P.  
Wymann, E. Hirsch, R. Wetzker  
*Neuroscience* 233 (2013) 44–53)

Eine der wichtigsten Funktionen von Immunzellen ist die Fähigkeit Pathogene mittels Phagozytose zu eliminieren. Mikroglia, als immunkompetente Zellen des Gehirns, reagieren nach Schädigung des Gewebes, dem Eindringen von Pathogenen nach Störung der Blut-Hirn-Schranke, mit einer Änderung ihrer Morphologie zum aktivierten Zustand. In diesem Stadium sind sie befähigt Mikroorganismen, apoptotische oder nekrotische Neuronen mittels Phagozytose zu entfernen. Während neuroprotektiver, als auch neurodegenerativer Prozesse, sind sie ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems des Gehirns. Das Signalprotein PI3K $\gamma$ , gilt als wichtiger Mediator essentieller immunologischer Prozesse im ZNS. Mittels genetisch modifizierter primärer Mikroglia aus PI3K $\gamma$  *knockout* und PI3K $\gamma$  *knockin* (*kinase dead*) Mäusen und Zellen aus Wildtyp Mäusen wurde untersucht, wie PI3K $\gamma$  die phagozytotische Aktivität in Mikrogliazellen reguliert. Die Vorstimulation der Zellen mit LPS induzierte den aktivierten Phänotyp. Anschließend erfolgte die Messung der phagozytotischen Aktivität mittels *Escherichia coli*- und FITC-markierter Zymosan Partikeln *in vitro* und *in vivo*. Es zeigte sich im PI3K $\gamma$ -*knockout* eine stark reduzierte Phagozytoserate im Gegensatz zu Wildtyp- und PI3K $\gamma$  *knockin* Mikroglia. Aufgrund dieses gleichen Phänotyps konnte die direkte Beteiligung der PI3K $\gamma$ -Lipidkinase-Aktivität ausgeschlossen werden. Der weitere Mechanismus, der infolgedessen untersucht wurde, war die *scaffold function*, die bereits mehrfach in anderen Zellsystemen beschrieben wurde. Hierbei übt PI3K $\gamma$  eine Gerüstfunktion aus, indem sie mit Proteinen, wie Phosphodiesterasen (PDE) interagiert und andere Signalwege indirekt reguliert. Mittels dieser regulatorischen Funktion kontrolliert PI3K $\gamma$  über PDE3B den zellulären cAMP-Spiegel. cAMP gilt als *second messenger* und unterdrückt Immunreaktionen, was deutlich in PI3K $\gamma$  *knockout* Mikrogliazellen nachgewiesen werden konnte. Die Lipidkinase-unabhängige Funktion von PI3K $\gamma$  als Mediator der Phagozytose wurde damit erstmals in Mikrogliazellen gezeigt.

## 3.1.2 Manuskript I

*Neuroscience* 233 (2013) 44–53

# PHOSPHOINOSITIDE 3-KINASE $\gamma$ MEDIATES MICROGLIAL PHAGOCYTOSIS VIA LIPID KINASE-INDEPENDENT CONTROL OF cAMP

C. SCHMIDT,<sup>a†</sup> N. SCHNEBLE,<sup>a†</sup> J. P. MÜLLER,<sup>a</sup>  
 R. BAUER,<sup>a,e</sup> A. PERINO,<sup>b</sup> R. MARONE,<sup>c</sup>  
 S. D. RYBALKIN,<sup>d</sup> M. P. WYMAN,<sup>e</sup> E. HIRSCH<sup>b</sup> AND  
 R. WETZKER<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Molecular Cell Biology, Center for Molecular Biomedicine, Jena University Hospital, 07745 Jena, Germany

<sup>b</sup> Molecular Biotechnology Center, University of Torino, 10126 Torino, Italy

<sup>c</sup> Department of Biomedicine, Institute of Biochemistry and Genetics, University Basel, 4058 Basel, Switzerland

<sup>d</sup> Department of Pharmacology, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA

<sup>e</sup> Center for Sepsis Control and Care, Jena University Hospital, 07747 Jena, Germany

**Abstract**—Microglial phagocytosis plays a key role in neuro-protective and neurodegenerative responses of the innate immune system in the brain. Here we investigated the regulatory function of phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) in phagocytosis of bacteria and Zymosan particles by mouse brain microglia *in vitro* and *in vivo*. Using genetic and pharmacological approaches our data revealed PI3K $\gamma$  as an essential mediator of microglial phagocytosis. Unexpectedly, microglia expressing lipid kinase deficient mutant PI3K $\gamma$  exhibited similar phagocytosis as wild-type cells. These data suggest kinase-independent stimulation of cAMP phosphodiesterase activity by PI3K $\gamma$  as a crucial mediator of phagocytosis. In sum our findings indicate PI3K $\gamma$ -dependent suppression of cAMP signaling as a critical regulatory element of microglial phagocytosis. © 2012 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Key words:** PI3K, PDE, cAMP, microglia, phagocytosis.

## INTRODUCTION

Microglia represent main constituents of the immune system in the central nervous system. They fulfill typical functions of innate immune cells including migration to sites of injury, phagocytosis of microbes and cell debris as well as release of specific cytokines (Kettenmann et al.,

2011). Numerous investigations have revealed involvement of microglia in the development and maintenance of neurological diseases and neurodegeneration (Prinz et al., 2011). In addition to the generation of neurotoxic mediators, phagocytosis of neurons was considered as a main cause of the neurodegenerative activities of microglia (Neher et al., 2012). The expanding understanding of the physiological and pathophysiological capacity of microglial phagocytosis contrasts with the limited knowledge on intracellular mediators of their phagocytic activities.

First indications for intracellular mechanisms controlling microglial phagocytosis emerged from investigations of cAMP signaling. Several reports demonstrated inhibitory effects of cAMP on microglial phagocytic activities (Makranz et al., 2006; Orr et al., 2009; Steininger et al., 2011). Both cAMP-dependent stimulation of protein kinase A (PKA) or Epac have been shown to convey these inhibitory effects.

Phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks) are additional candidate mediators of microglial phagocytosis due to their proposed regulatory function in phagocytic reactions of neutrophils and macrophages (Lee et al., 2007; Tamura et al., 2009). Four species of the class 1 PI3K family produce the second messenger phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP<sub>3</sub>), which controls a multitude of cellular functions (Hawkins et al., 2006). The PI3K isoform PI3K $\gamma$  was originally characterized as a major mediator of G-protein-coupled receptor agonists. In addition to its eponymous lipid kinase activity PI3K $\gamma$  has been shown to repress cAMP production in cardiomyocytes via stimulation of cAMP phosphodiesterase (Patrucco et al., 2004). Expression of PI3K $\gamma$  was documented in immune cells and cells of the cardiovascular system (Patrucco et al., 2004; Fruman and Bismuth, 2009). Recent investigations located expression of PI3K $\gamma$  in the nervous system, specifically in dorsal root ganglia (Konig et al., 2010; Cunha et al., 2010) and microglia (Jin et al., 2010).

Our present study uncovered a critical function of PI3K $\gamma$  in phagocytic reactions of microglia. PI3K $\gamma$ -dependent control of cAMP production has been disclosed as a crucial regulator of microglial phagocytosis.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Antibodies

Monoclonal p110 $\gamma$  antibodies and polyclonal antibodies against p84, p101 and PDE3B have been produced in our facilities in Jena, Basel and Seattle. Other antibodies were obtained from Cell Signaling (Danvers, USA): p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , pAKT Ser473,

\*Corresponding author. Tel: +49-3641-9395600; fax: +49-3641-9395602.

E-mail address: Reinhard.Wetzker@uni-jena.de (R. Wetzker).

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

**Abbreviations:** DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FCS, fetal calf serum; FITC, fluorescein-isothiocyanate; KD, kinase-dead; KO, knockout; PBS, phosphate-buffered saline; PDE, cAMP phosphodiesterase; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PI3K $\gamma$ , phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$ ; PIP<sub>3</sub>, phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate; PKA, protein kinase A.

panAKT, pCREB Ser133, panCREB and PKA  $\alpha$ , Upstate (Lake Placid, USA); p110 $\delta$  and Sigma Aldrich (Steinheim, Germany);  $\beta$ -Actin.

For immunoprecipitation BV-2 cell lysates were cleared by centrifugation at 13,000 rpm, 15 min at 4 °C. Supernatants were incubated with p110 $\gamma$  monoclonal antibody and Protein-G-Sepharose beads (GE Healthcare) for 24 h. The immunoprecipitate was analyzed by Western blotting.

### Inhibitors

The PI3K $\gamma$  Inhibitor AS605240 was obtained from Alexis (Lausen, Switzerland). The inhibitors TGX221 (PI3K $\beta$ ) and IC87114 (PI3K $\delta$ ) were purchased from Baker Heart Research Institute (Melbourne, Australia). Inhibitor A66 (PI3K $\alpha$ ) was obtained from Symansis (Auckland, New Zealand). Wortmannin as a general PI3K inhibitor was purchased from Sigma (St. Louis, USA). Other inhibitors obtained from Sigma include IBMX, rolipram and cilostamide. Forskolin, PTX and H89 were obtained from Enzo Life Science (New York, USA).

### BV-2 cells

BV-2 an immortalized murine microglia cell line was cultured at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) high glucose from PAA Laboratories (Dartmouth, USA) containing 10% fetal calf serum (FCS), 1% penicillin/streptomycin and 1% amphotericin B.

### shRNA-mediated down regulation of gene expression

The generation of specific shRNA cell lines has been described previously (Bekhte et al., 2011). Plasmid pLKO.1 vectors encoding shRNA constructs targeting PI3K p110 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  or  $\delta$  catalytic subunits and regulatory p84 and p101 subunits, or plasmid pLKO.1 encoding a non-targeting control shRNA were obtained from the Sigma–Aldrich (Taufkirchen, Germany). For generation of lentiviral particles, HEK293T cells were transfected with pLKO.1 derivative plasmids in combination with pRev, pEnv-VSV-G, and pMDLg. BV-2 cells were infected three times with the pseudotyped particles in the presence of 8  $\mu$ g/ml polybrene. The transduced cell pools were selected with 2  $\mu$ g/ml puromycin 48 h post transduction for 10 days. Down regulation of the catalytic and regulatory subunits of the PI3K class I was tested by Western blot analysis.

### Mouse lines

PI3K $\gamma$  knockout (KO) and PI3K $\gamma$  kinase-dead (KD) mice (Patrucco et al., 2004) were on the C57BL/6J background. C57BL/6J wild-type mice were used as controls.

### Primary microglia cells

The microglia cells were isolated from neonatal mouse cerebral cortex as described (Giulian and Baker, 1986). The cells were co-cultivated with astrocytes for 14 days at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in DMEM high glucose containing 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin and 1% amphotericin B. After 14 days adherent microglia were separated from astrocytes by adding PBS/EDTA and careful shaking. After harvesting microglial cells were seeded in well plates.

### SDS PAGE and Western blotting

For quantification of protein expression and phosphorylation cells were seeded into 6-well plates and incubated at 37 °C (5% CO<sub>2</sub>). After becoming adherent, cells were incubated over night in DMEM medium w/o FCS and treated for 24 h with agonists or

inhibitors. Thereafter cells were suspended in RIPA lysis buffer composed of 50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 0.5% (v/v) deoxycholate, 0.1% (w/v) SDS, 100  $\mu$ g/ml Pefa-Block, 1  $\mu$ g/ml pepstatin, 10  $\mu$ M sodium vanadate and 1  $\mu$ g/ml leupeptin. Referring to a 20-min centrifugation at 13500g, 4 °C, supernatants were mixed with 5 $\times$  protein sample buffer (5% SDS, 33% glycerol, 25%  $\beta$ -mercaptoethanol) and heated to 95 °C for 5 min. Protein samples were separated on 10% polyacrylamide-Gel, transferred to a polyvinylidenefluorid membrane and immunoblotted with indicated antibodies followed by enhanced chemiluminescence reaction.

### cAMP assay

Microglial cells were seeded in 96-well clear-bottom plates and treated with different inhibitors. cAMP was measured following the manufacturer's protocol (Promega, cAMP GloAssayKit).

### Phagocytosis assay *in vitro*

Efficiency of phagocytosis was investigated as described (Sun et al., 2008). Primary microglia cells and BV-2 cells were seeded into 6-well plates and incubated at 37 °C (5% CO<sub>2</sub>) for 24 h. After attachment cells were starved for 24 h in DMEM without FCS. Phagocytosis assay was performed using GFP-producing *Escherichia coli*. Forty microliters of the suspended bacteria was added to the microglial cells and incubated 1 h at 37 °C (5% CO<sub>2</sub>). After incubation the cells were harvested, washed and re-suspended in PBS. The phagocytic activity of the cells was measured by flow cytometry using FACS Canto (BD, Heidelberg, Germany).

### Phagocytosis assay *in vivo*

Experiments were performed on adult PI3K $\gamma$  KO and wild-type mice (5 mice per group, weighing 19–24 g). Animal procedures were approved by the committee of the Thuringian State Government on Animal Research. Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of a cocktail comprising midazolam (5 mg/kg), fentanyl (0.05 mg/kg), and medetomidin (0.5 mg/kg). Kainate (0.21  $\mu$ g in 50 nl saline) was stereotactically injected into the dorsal hippocampus on each side with a 0.5- $\mu$ l microsyringe over 60 s. Stereotaxic coordinates were AP,  $-1.6$  mm; L,  $\pm 1.6$  mm; and V,  $-1.5$  mm, respectively (Paxinos and Franklin, 2001). Subsequently, anesthesia was terminated by intraperitoneal injection of atipamezol (2.5 mg/kg), naloxon (1.2 mg/kg), and flumazenil (0.5 mg/kg). After antagonization of anesthesia animals woke up within 1–2 min and developed signs of nonconvulsive seizures as shown by clonic forepaw movements and chewing lasting several hours. Thereby, an intensified microglial cell activation is induced by increased expression of inflammatory mediators in the hippocampus, followed within 24–48 h by microglial proliferation, and a modification of microglia morphology characterized by larger somata and thicker primary processes (Avignone et al., 2008). Furthermore, microglial cells express the metabotropic P2Y6 receptor whose activation by endogenous agonist UDP triggers microglial phagocytosis (Koizumi et al., 2007). Accordingly, 24 h later mice were re-anesthetized and 50 nl of fluorescein-isothiocyanate (FITC)-labeled Zymosan particles (9800 per  $\mu$ l) were stereotactically (identical stereotaxic coordinates) injected into the dorsal hippocampus. Twenty-four hours later mice were deeply anesthetized and perfused with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer by cardiac puncture via the left ventricle. Brains were removed immediately after fixation, post-fixed in 4% paraformaldehyde at 4 °C for 1 day and embedded in paraffin. Referring to Koizumi et al. (2007), for quantitative immunohistochemical analysis of *in vivo* phagocytosis, coronal sections (6  $\mu$ m) of the hippocampus containing the FITC-

labeled Zymosan particles-injected sites were thoroughly washed with 0.3% Triton X-100 containing PBS (shaking for 10 min, 10 times) to remove non-specific binding of the microspheres. Chosen thickness of coronal sections (6  $\mu$ m) warrants undoubtedly the assignment of intramicroglial, hence phagocytized fluorescent Zymosan particles. Sections were then stained with anti-Iba1 antibody using the antigen retrieval (microwave, 750 W, 10 min, 0.01 mol/l citrate buffer) and the avidin–biotin–peroxidase complex methods (Vectastain ABC staining kit, Vector Labs) to visualize microglia. Evaluation of phagocytosis of the fluorescent particles by microglial cells was performed under a light microscope (Olympus BX61). Localization of labeled Zymosan was performed by merged pictures obtained by bright-field imaging and fluorescence microscopy. The total number of microglial cells incorporating fluorescent particles in relation to the total number of Iba1-positive cells was counted and used as an index of *in vivo* phagocytosis. Three sections containing the microspheres-injected sites per each animal were analyzed, and at least four animals per each group were used. In each case the slice with the highest number of FITC-labeled Zymosan particles was chosen together with a rostral as well as a caudal slice in a distance of 48  $\mu$ m in order to warrant that every phagocytizing microglial cell has been counted just for one time. In each slice between 186 and 223 microglial cells were scored.

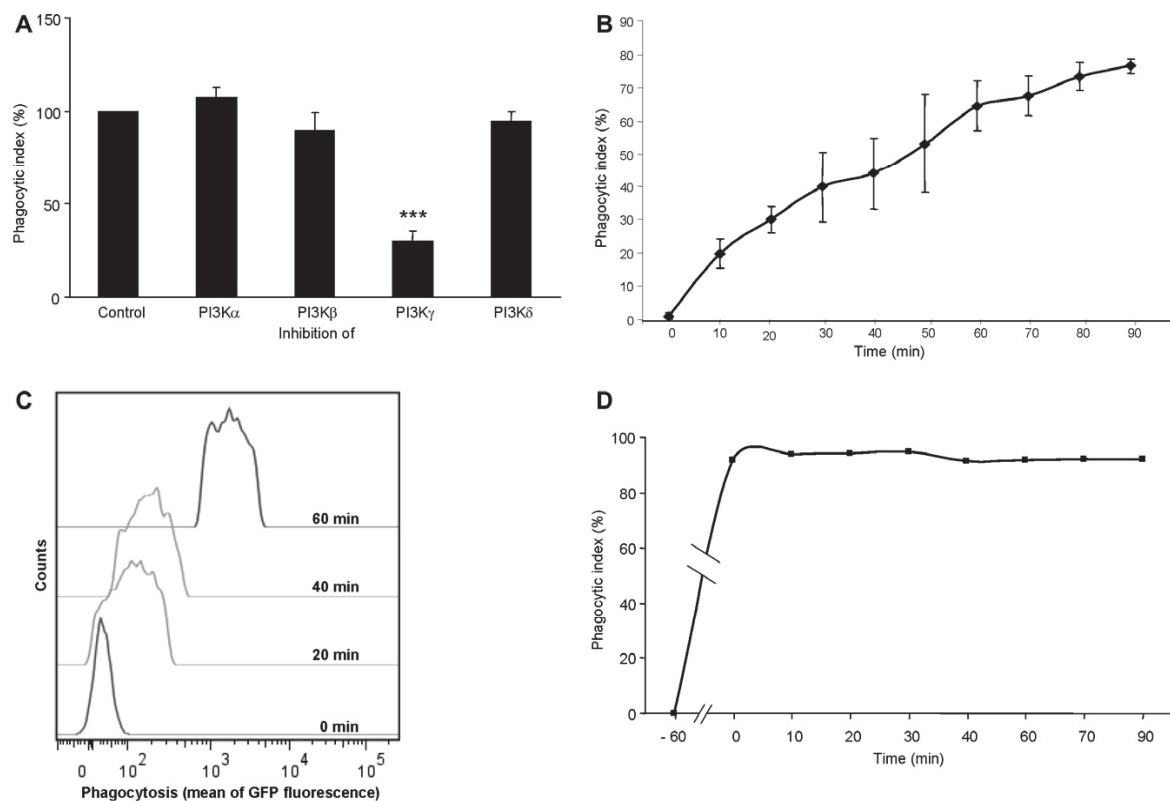
### Statistical analysis

Data are reported as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Comparisons between groups were made with one-way analysis of variance (ANOVA). Post hoc comparisons were made with the Holm–Sidak test. Comparisons between groups were made with unpaired t tests using Bonferroni correction for multiple uses, if appropriate. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### PI3K $\gamma$ mediates microglial phagocytosis

To explore the role of PI3K in the control of phagocytosis microglia were isolated from mouse brain and treated with inhibitors specifically inhibiting the lipid kinase activities of the PI3K species PI3K $\alpha$  (A66), PI3K $\beta$  (TGX221), PI3K $\gamma$  (AS605240) and PI3K $\delta$  (IC87114) and incubated with GFP producing *E. coli*. Only AS605240 suppressed uptake of bacteria indicating PI3K $\gamma$  as a mediator of phagocytic activities of microglia (Fig. 1A). The uptake of GFP-labeled *E. coli* by primary microglia has been further characterized by kinetic analysis (Fig. 1B, C).



**Fig. 1.** PI3K $\gamma$  mediates phagocytosis of *E. coli* by primary microglia. (A) Microglia isolated from mouse brain were pretreated for 60 min with inhibitors of the PI3K species PI3K $\alpha$  [30 nM A66], PI3K $\beta$  [20 nM TGX221], PI3K $\gamma$  [1  $\mu$ M AS605240] and PI3K $\delta$  [200 nM IC87114] and phagocytosis was assayed by FACS after 60-min incubation.  $n = 4$ , \*\*\* $P < 0.001$ , compared to control. (B, C) Time-dependent uptake of GFP-producing *E. coli* by primary microglia. Microglia isolated from mouse brain were incubated with GFP-producing *E. coli* particles for the indicated periods and phagocytic active cells were quantified using by flow cytometry. (D) Pulse chase experiment. Phagocytosis of GFP-producing *E. coli* was quenched after 60 min by addition of a 80-fold excess of unlabeled bacteria and GFP fluorescence was monitored for indicated time points using flow cytometry.

The pulse chase experiment shown in Fig. 1D reveals absence of significant degradation of the GFP-labeled *E. coli* or unspecific attachment of bacteria to the microglia.

To verify pharmacological indications for an important role of PI3K $\gamma$  in microglia phagocytosis siRNA technology has been used. The BV-2 mouse microglia cell line was transduced with lentiviral particles carrying shRNA genes specifically targeting the PI3K species  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$ . As shown in Fig. 2A solely the decline of PI3K $\gamma$  expression was accompanied by a reduction of phagocytosis of *E. coli* by BV-2 cells. These data suggest an essential role of PI3K $\gamma$  in microglial phagocytosis. Down regulation of PI3K $\alpha$ , PI3K $\beta$  and PI3K $\delta$  did not affect the phagocytic activity. As has been shown in Fig. 2B expression of the catalytic subunits of all PI3K species assayed by Western blotting was significantly reduced.

We next compared phagocytosis of microglia from wild-type and PI3K $\gamma$ -deficient mice *in vitro* and *in vivo*. As shown in Fig. 3A, B and the histograms in Fig. 3C, isolated wild-type microglia expressed significantly a higher uptake of *E. coli*. Similar results were obtained using FITC Zymosan particles for investigating PI3K $\gamma$  dependence of microglial phagocytosis (Kettenmann et al., 2011) (data not shown).

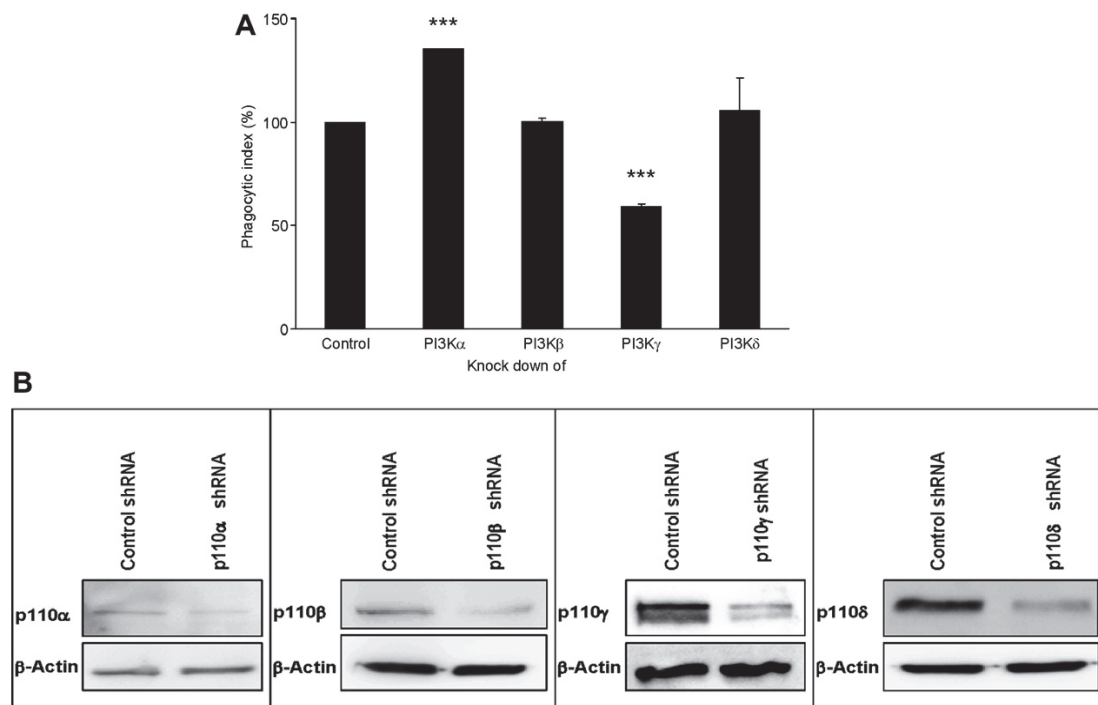
To investigate the phagocytosis *in vivo* FITC-labeled Zymosan particles were injected into the dorsal hippocampus of adult PI3K $\gamma$  KO and wild-type mice after microglial cell activation by focal seizure induction

(Groticke et al., 2008; Koizumi et al., 2007) (Fig. 4A). As shown in Fig. 4B microglial phagocytosis in the brain of PI3K $\gamma$  KO mice is significantly suppressed in comparison to wild-type brain. Taken together these data disclose PI3K $\gamma$  as a crucial mediator of microglial phagocytosis.

### Signaling reactions of PI3K $\gamma$ mediating microglial phagocytosis

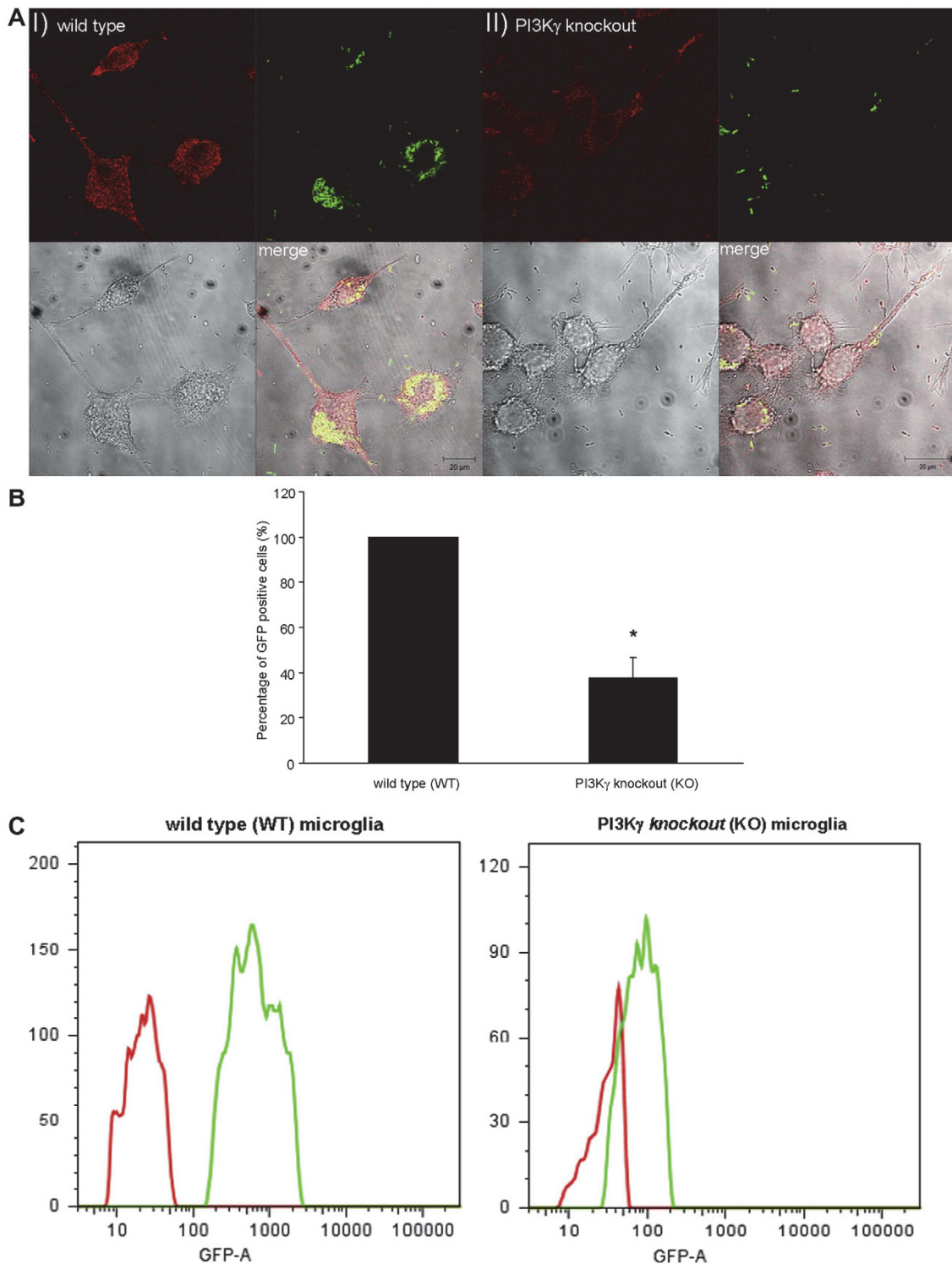
Next we asked for specific signaling functions of PI3K $\gamma$  involved in microglial phagocytosis. PI3K $\gamma$  exists in different cell types as a dimer including a p84 or p101 regulatory subunits associated with the catalytic subunit p110 $\gamma$  and both regulatory subunits were demonstrated to exert stimulatory effects on PI3K $\gamma$  lipid kinase activity (Bohnacker et al., 2009). In the microglia cell line BV-2 decreased expression of p84 or p101 induced by specific shRNA did not affect microglial phagocytosis in contrast to suppression of the catalytic subunit p110 $\gamma$  (Fig. 5A). In these experiments shRNA knock down led to about 80% decline of the regulatory subunits as assayed by Western blotting (Fig. 5B). These data suggest minor importance of p84 and p101 in the control of phagocytic reactions of microglia.

In addition to its lipid kinase activity PI3K $\gamma$  was shown to induce stimulation of cAMP phosphodiesterase 3B (PDE3B) via a lipid kinase-independent direct interaction in cardiomyocytes (Patrucco et al., 2004). Regulatory functions of this scaffold protein activity of PI3K $\gamma$  have

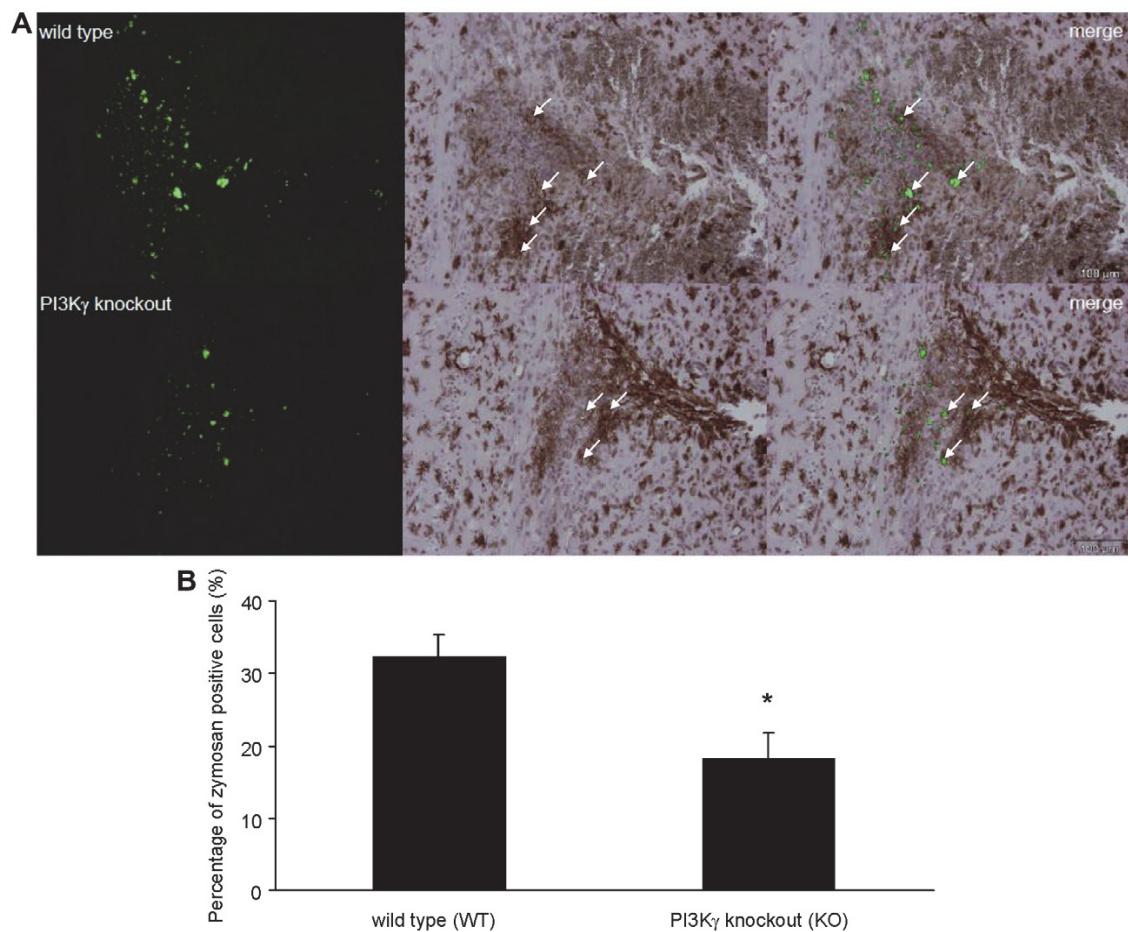


**Fig. 2.** PI3K $\gamma$  mediates phagocytosis of *E. coli* by microglial BV-2 cells. (A) Bacteria were added to BV-2 cell lines stably expressing shRNA genes targeting p110 $\alpha$  p110 $\beta$  p110 $\gamma$  p110 $\delta$  or non-targeting control. Phagocytosis was measured by flow cytometry.  $n = 3$ , \*\*\* $P < 0.001$ , compared to control. (B) shRNA effects on expression levels of PI3K species or regulatory subunits.





**Fig. 3.** PI3K $\gamma$  mediates phagocytosis of *E. coli* by primary microglia. (A) Representative confocal images of *E. coli* phagocytosis by primary microglia isolated from wild-type and PI3K $\gamma$ -deficient mice. Microglia were stained with WGA-wheat germ agglutinin (red). The visualized bacteria (green) are intracellular (merged image). (B) Phagocytosis of *E. coli* by PI3K $\gamma$  KO microglia in comparison to wild-type cells. The total number of microglial cells incorporating fluorescent bacteria in relation to the absolute number of microglial cells was counted and used as an index of *in vitro* phagocytosis.  $n = 3$ , each group; \* $P < 0.05$ , compared to wild-type microglia. (C) Flow cytometric analysis of phagocytosis. Histograms demonstrate GFP fluorescence before (red) and after phagocytosis for 60 min (green) for wild-type and PI3K $\gamma$  KO primary microglia.

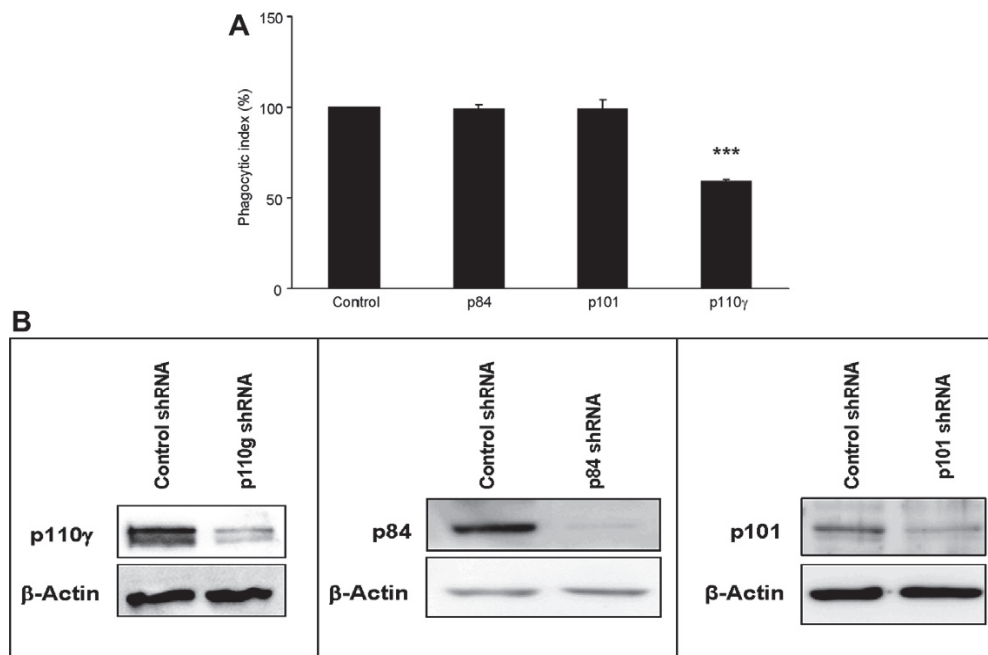


**Fig. 4.** Phagocytosis of FITC-labeled Zymosan particles by microglia in mouse brain. (A) Representative images of phagocytosis of FITC Zymosan particles by microglia in mouse brain from wild-type (upper panel) and PI3K $\gamma$ -deficient mice (lower panel). The left-sided image section shows the distribution of FITC Zymosan particles (green), the intermediate image section shows Iba1-positive (brownish-stained) cells and the right-sided image section presents the merged picture. Note the intracellular localization of FITC-labeled Zymosan within Iba1-positive (brownish-stained) cells, indicated by white arrows. (B) Phagocytosis of FITC Zymosan particles in the brain of PI3K $\gamma$  KO mice in comparison to wild-type brain. The total number of microglial cells incorporating fluorescent particles in relation to the total number of microglial cells was counted and used as an index of *in vivo* phagocytosis.  $n = 5$ , each group; \* $P < 0.05$ , compared to wild-type mice.

been explored by investigating of the phenotype of cardiomyocytes isolated from transgenic mice, which express a lipid kinase inactive version of the catalytic subunit p110 $\gamma$  (KD knock in mutant). We used comparative analysis of microglia isolated from PI3K $\gamma$  KO mice with microglia produced from mice expressing catalytically inactive PI3K $\gamma$  KD to investigate the potential role of the scaffold function of PI3K $\gamma$  in microglial phagocytosis. Intriguingly, microglia expressing the lipid kinase deficient mutant of PI3K $\gamma$  revealed similar phagocytic activity as wild-type cells (Fig. 6). In contrast, PI3K $\gamma$  KO microglia exhibited low phagocytic activity. Since stimulation of PDE activity represents the only known signaling activity shared by wild-type PI3K $\gamma$  and catalytically inactive KD mutant these data suggest a major role of the cAMP repressing function of PI3K $\gamma$  in the control of phagocytosis.

#### cAMP-dependent inhibition of microglial phagocytosis

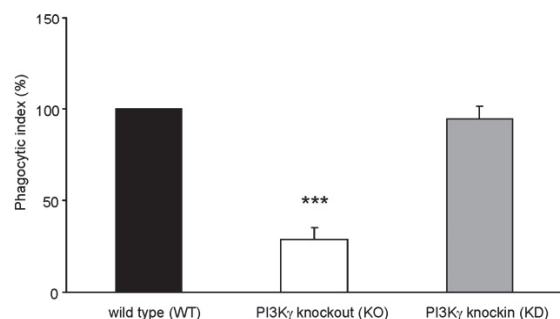
Tracing these data to PI3K $\gamma$  controlled regulatory function of cAMP we further investigated the effects of pharmacological agents affecting the cAMP level, cAMP-dependent PKA or Epac activities on microglial phagocytosis. Adding forskolin as an activator of adenylate cyclase and treatment with the inhibitors of cAMP phosphodiesterases IBMX, rolipram (PDE4) and cilostamide (PDE3B) or addition of the agonists of PKA (6-Benz cAMP) or Epac (8-CPT-2'-O-Me-cAMP) produced uniformly inhibition of microglial phagocytosis down to the level of PI3K $\gamma$  KO microglia (Fig. 7A). In line with these data treatment of microglia with agonists of the G $_s$ -coupled A $_{2A}$  adenosine receptor as well as CGS-21680 suppressed the phagocytic reaction of



**Fig. 5.** Role of PI3K $\gamma$  adaptor proteins p84 and p101 in microglial phagocytosis. (A) Phagocytosis of *E. coli* by BV-2 cells. Suspended bacteria were added to BV-2 cell lines stably expressing shRNA genes targeting p84, p101 or catalytic subunit p110 $\gamma$  and phagocytic activity was measured by flow cytometry.  $n = 6$ , \*\*\* $P < 0.001$ , compared to control. (B) shRNA-induced suppression of regulatory subunits p84 and p101 of PI3K $\gamma$  in BV-2 cells.

microglia again down to the level of phagocytosis by PI3K $\gamma$  KO microglia (Fig. 7B). Conversely, the PKA inhibitor H89 stimulated phagocytosis in untreated microglia and rescued the inhibitory effects of A<sub>2A</sub> receptor agonists. The incomplete rescue effect of H89 in the presence of CGS-21680 or adenosine may indicate significant contribution of Epac to the cAMP-dependent inhibitory effect on phagocytosis. Taken together, these data specify cAMP as a mediator blocking microglial phagocytosis. Both cAMP-dependent signaling proteins PKA and Epac may be involved in suppression of the phagocytic reaction. Collectively our data are in accordance with recent reports on cAMP effects on phagocytosis in microglia and macrophages (Steininger et al., 2011; Orr et al., 2009; Gosain et al., 2007), which reveal inhibition of microglial phagocytosis by specific stimulation of cAMP signaling.

Next we sought to directly assess specific regulatory effects of PI3K $\gamma$  on cAMP signaling in microglia. cAMP levels were measured in microglia isolated from brain of wild-type, PI3K $\gamma$  KO or PI3K $\gamma$  KD mice. The data shown in Fig. 8A consistently revealed strongly increased cAMP levels in PI3K $\gamma$  KO cells. In contrast, microglia expressing the catalytically inactive PI3K $\gamma$  KD mutant exhibited low cAMP level, which was comparable to wild-type cells. A similar relation was observed if cAMP levels in these microglia were measured by assaying phosphorylation of the cAMP response element-binding transcription factor CREB (Fig. 8B). These data suggest PI3K $\gamma$ -dependent stimulation of cAMP phosphodiesterase as a critical mediator of cAMP signaling in microglia.

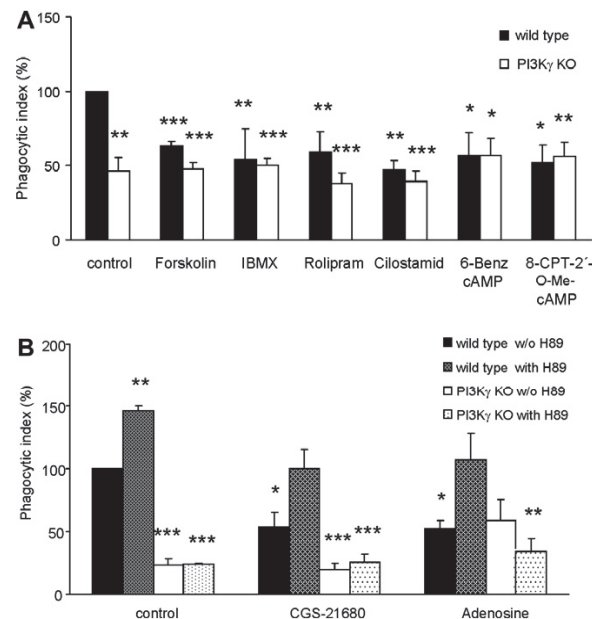


**Fig. 6.** Role of PI3K $\gamma$  lipid kinase activity in microglial phagocytosis. Phagocytosis of *E. coli* by primary microglia. Microglia isolated from mouse brain of wild type, PI3K $\gamma$  KO and lipid kinase-deficient PI3K $\gamma$  KD mutant were incubated with *E. coli* and phagocytosis was assayed by FACS.  $n = 4$ , \*\*\* $P < 0.001$ , compared to control.

Stimulatory effects of PI3K $\gamma$  on cAMP phosphodiesterase activity and direct binding to PDE3B have been identified in cardiomyocytes (Patrucco et al., 2004). To assess the possible role of this mechanism for cAMP-mediated regulation of phagocytosis, we immunoprecipitated PI3K $\gamma$  from microglia and examined associated proteins by Western blotting (Fig. 8C). Indeed PDE3B could be detected in the immunoprecipitate favoring this PDE isoform as the relevant interaction partner for the inhibitory effects of PI3K $\gamma$  on cAMP level in microglia.

The dominant regulatory effects of PI3K $\gamma$  on cAMP controlled phagocytosis seem contradictory to the strong suppression of microglial phagocytosis by inhibitors of





**Fig. 7.** Role of cAMP, PKA or Epac in phagocytosis by wild-type and PI3K $\gamma$  KO microglia. (A) Effects of pharmacological modulation of cAMP, PKA or Epac activity on *E. coli* phagocytosis by wt, or PI3K $\gamma$  KO primary microglia. Cells were treated with 100  $\mu$ M forskolin (activator of adenylate cyclase), 500  $\mu$ M IBMX (pan-PDE inhibitor), 10  $\mu$ M rolipram (PDE4 inhibitor), 10  $\mu$ M cilostamide (PDE3B inhibitor), 2 mM 6-Benz cAMP (agonist of PKA) or 2 mM 8-CPT-2'-O-Me-cAMP (agonist of Epac). Phagocytosis of *E. coli* was assayed by flow cytometry. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001, compared to wild-type control. (B) Effects of adenosine  $A_{2A}$  receptor agonists adenosine (50  $\mu$ M) and CGS-21680 (50  $\mu$ M) on phagocytosis by wild-type or KO primary microglia and rescue with PKA inhibitor H89 (10  $\mu$ M). After treatment with the agonists and/or PKA inhibitor cells were incubated with *E. coli* and phagocytosis was assayed by flow cytometry. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001, compared to wild type without (w/o) H89 administration.

PI3K $\gamma$  lipid kinase activity shown in Fig. 1A. Thus we asked for possible effects of the PI3K inhibitors AS605240 and wortmannin on cAMP level. Intriguingly, our investigations revealed strong stimulatory effects of both PI3K inhibitors on cAMP level in wild-type microglia and cells expressing the lipid kinase inactive KD mutant (Fig. 8D).

Taken together, these data indicate control of cAMP level by direct interaction of PI3K $\gamma$  with PDE3B as a main mediator of microglial phagocytosis. Functional relevance of unknown other protein interactions of PI3K $\gamma$  cannot be excluded.

## DISCUSSION

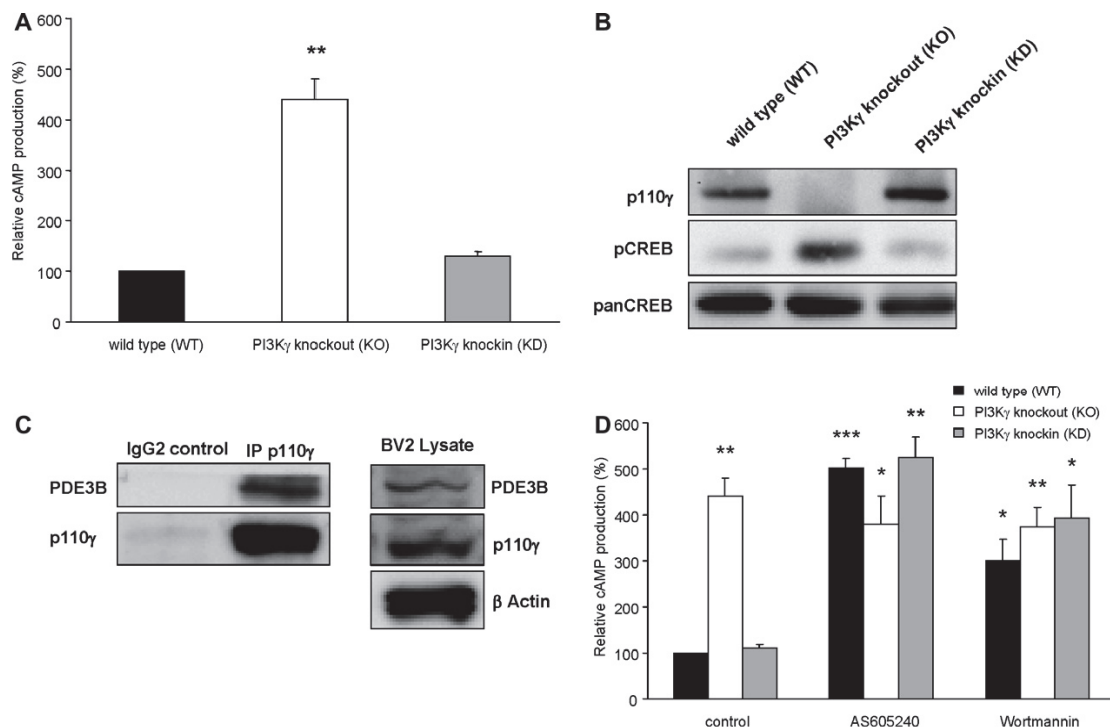
Recent studies revealed particular importance of microglial phagocytic activities for their physiological and pathological functions (Kettenmann et al., 2011; Neher et al., 2012). Whereas a whole series of extracellular phagocytosis-promoting agonists and receptors have been characterized, the current knowledge about intracellular mediators of microglial phagocytosis has remained very limited.

Here we describe a key function of the signaling protein PI3K $\gamma$  in the control of microglial phagocytosis. Employing pharmacological and genetic approaches our results unveiled PI3K $\gamma$  as an essential mediator of the phagocytic uptake of *E. coli* bacteria and FITC Zymosan particles in the *in vitro* and *in vivo* models used. These results seem in line with recent reports on an essential

role of the PI3K signaling in phagocytosis of the monocytic cell line THP-1 (Lee et al., 2007) or the macrophage cell line RAW.264.7 (Tamura et al., 2009). Using siRNA approaches it was shown that knock down of PI3K $\alpha$  inhibited phagocytosis whereas induced suppression of the PI3K antagonists PTEN or SHIP-1 (Tamura et al., 2009) provoked stimulatory effects on the phagocytic activities. Both authors concluded that phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate the product of PI3K lipid kinase activity functioned as an essential mediator of phagocytic activities of monocytes and macrophages.

In contrast to these literature data, our results indicate stimulatory effects of PI3K $\gamma$  on PDE3B activity followed by a decline of cAMP level as crucial mediator of microglial phagocytosis. The data disclose PI3K $\gamma$  as a novel player in cAMP signaling in the innate immune system and corroborate recent reports on inhibitory functions of cAMP and its downstream mediators PKA and Epac on microglial phagocytosis (Lee et al., 2007; Tamura et al., 2009). Analogous functions of the cAMP repressing function of PI3K $\gamma$  in other immune cells can be hypothesized.

Intriguingly the repressing effects of PI3K inhibitors wortmannin and AS605240 on microglial phagocytosis were accompanied by an increase of cAMP level. These data suggest indirect control of cAMP by PI3K lipid kinase in microglia. Indeed, stimulatory effects of PI3K on PDE3B activity have been proposed in adipocytes via PKB/Akt-dependent phosphorylation of PDE3B



**Fig. 8.** Effects of PI3K $\gamma$  on cAMP level in microglia. (A) cAMP level in primary microglia expressing wild-type, KO and lipid kinase-deficient KD mutant of PI3K $\gamma$ . Microglial cells were seeded in 96-well plates and cAMP was measured using cAMP GloAssayKit.  $n = 3$ . \*\* $P < 0.01$ , compared to wild-type microglial cells. Mean cAMP level in wild-type microglia cells (100%) corresponds to 127 pmol per 1  $\mu$ g protein. (B) cAMP-dependent CREB phosphorylation in wt, KO and KD primary microglia. CREB phosphorylation has been assayed by Western blotting using specific pCREB antibodies. A representative blot is shown. (C) Interaction of PI3K $\gamma$  with PDE3B in BV-2 cells. Co-immunoprecipitation of p110 $\gamma$  with PDE3B. (D) cAMP level in wild-type, KO and KD primary microglia. Effects of AS605240 (1  $\mu$ M) or wortmannin (100 nM). Microglial cells were seeded in 96-well plates and cAMP was measured.  $n = 3$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , compared to wild-type control (mean 127 pmol cAMP per 1  $\mu$ g protein).

(Baragli et al., 2011; Degerman et al., 2011). In line with these results PI3K inhibition in microglia may lead to suppression of PDE3B activity by preventing PKB/Akt-dependent phosphorylation. As a consequence, increasing cAMP will possibly repress phagocytosis.

Following these results PI3K inhibitors seem to be applicable for the suppression of the microglial phagocytosis of viable neurons, which has been observed during inflammatory processes in the central nervous system (Neher et al., 2012). If this could be established, inhibitors of PI3K and also PDE3B might be used as potential setscrews for the pharmacological treatment of neurodegenerative diseases.

## CONCLUSIONS

Our data introduce the signaling protein PI3K  $\gamma$  as a key mediator of microglial phagocytosis. In contrast to recent reports on regulatory functions of PI3K in phagocytosis of macrophages our data suggest lipid kinase-independent stimulation of PDE activity by PI3K $\gamma$  as a crucial mediator of phagocytic activities of microglia. These results implement the suppressive effect of PI3K $\gamma$  on cAMP as a mediator of immune cell functions.

**Acknowledgement**—This work was supported by DFG Research Grant RTG 1715.

## REFERENCES

- Avignone E, Ulmann L, Levavasseur F, Rassendren F, Audinat E (2008) Status epilepticus induces a particular microglial activation state characterized by enhanced purinergic signaling. *J Neurosci* 28:9133–9144.
- Baragli A, Ghe C, Arnoletti E, Granata R, Ghigo E, Muccioli G (2011) Acylated and unacylated ghrelin attenuate isoproterenol-induced lipolysis in isolated rat visceral adipocytes through activation of phosphoinositide 3-kinase gamma and phosphodiesterase 3B. *Biochim Biophys Acta* 1811:386–396.
- Bekhitte MM, Finkensieper A, Binas S, Müller J, Wetzker R, Figulla HR, Sauer H, Wartenberg M (2011) VEGF-mediated PI3K class IA and PKC signaling in cardiomyogenesis and vasculogenesis of mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci* 124:1819–1830.
- Bohnacker T, Marone R, Collmann E, Calvez R, Hirsch E, Wymann MP (2009) PI3Kgamma adaptor subunits define coupling to degranulation and cell motility by distinct PtdIns(3,4,5)P3 pools in mast cells. *Sci Signal* 2:ra27.
- Cunha TM, Roman-Campos D, Lotufo CM, Duarte HL, Souza GR, Verri Jr WA, Funez MI, Dias QM, Schivo IR, Domingues AC, Sachs D, Chiavegatto S, Teixeira MM, Hotherhall JS, Cruz JS, Cunha FQ, Ferreira SH (2010) Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:4442–4447.

- Degerman E, Ahmad F, Chung YW, Guirguis E, Omar B, Stenson L, Manganiello V (2011) From PDE3B to the regulation of energy homeostasis. *Curr Opin Pharmacol* 11:676–682.
- Franklin KBJ, Paxinos G (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed. Orlando, FL, USA: Academic Press.
- Fruman DA, Bismuth G (2009) Fine tuning the immune response with PI3K. *Immunol Rev* 228:253–272.
- Giulian D, Baker TJ (1986) Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci* 6:2163–2178.
- Gosain A, Muthu K, Gamelli RL, DiPietro LA (2007) Norepinephrine suppresses wound macrophage phagocytic efficiency through alpha- and beta-adrenoreceptor dependent pathways. *Surgery* 142:170–179.
- Groticke I, Hoffmann K, Loscher W (2008) Behavioral alterations in a mouse model of temporal lobe epilepsy induced by intrahippocampal injection of kainate. *Exp Neurol* 213:71–83.
- Hawkins PT, Anderson KE, Davidson K, Stephens LR (2006) Signalling through class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* 34:647–662.
- Jin R, Yu S, Song Z, Quillin JW, Deas DP, Penninger JM, Nanda A, Granger DN, Li G (2010) Phosphoinositide 3-kinase-gamma expression is upregulated in brain microglia and contributes to ischemia-induced microglial activation in acute experimental stroke. *Biochem Biophys Res Commun* 399:458–464.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91:461–553.
- Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, Joshi BV, Jacobson KA, Kohsaka S, Inoue K (2007) UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 446:1091–1095.
- König C, Gavrilova-Ruch O, von Banchet GS, Bauer R, Grun M, Hirsch E, Rubio I, Schulz S, Heinemann SH, Schaible HG, Wetzker R (2010) Modulation of mu opioid receptor desensitization in peripheral sensory neurons by phosphoinositide 3-kinase gamma. *Neuroscience* 169:449–454.
- Lee JS, Nauseef WM, Moeenrezakhanlou A, Sly LM, Noubir S, Leidal KG, Schlomann JM, Krystal G, Reiner NE (2007) Monocyte p110alpha phosphatidylinositol 3-kinase regulates phagocytosis, the phagocyte oxidase, and cytokine production. *J Leukoc Biol* 81:1548–1561.
- Makranz C, Cohen G, Reichert F, Kodama T, Rotshenker S (2006) CAMP cascade (PKA, Epac, adenylyl cyclase, Gi, and phosphodiesterases) regulates myelin phagocytosis mediated by complement receptor-3 and scavenger receptor-AI/II in microglia and macrophages. *Glia* 53:441–448.
- Nehrer JJ, Neniskyte U, Brown GC (2012) Primary phagocytosis of neurons by inflamed microglia: potential roles in neurodegeneration. *Front Pharmacol* 3:27.
- Orr AG, Orr AL, Li XJ, Gross RE, Traynelis SF (2009) Adenosine A(2A) receptor mediates microglial process retraction. *Nat Neurosci* 12:872–878.
- Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, Marengo S, Russo G, Azzolino O, Rybalkin SD, Silengo L, Altruda F, Wetzker R, Wymann MP, Lembo G, Hirsch E (2004) PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* 118:375–387.
- Prinz M, Priller J, Sisodia SS, Ransohoff RM (2011) Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci* 14:1227–1235.
- Steininger TS, Stutz H, Kerschbaum HH (2011) Beta-adrenergic stimulation suppresses phagocytosis via Epac activation in murine microglial cells. *Brain Res* 1407:1–12.
- Sun HN, Kim SU, Lee MS, Kim SK, Kim JM, Yim M, Yu DY, Lee DS (2008) Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase-dependent activation of phosphoinositide 3-kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signal pathways is required for lipopolysaccharide-induced microglial phagocytosis. *Biol Pharm Bull* 31:1711–1715.
- Tamura N, Hazeki K, Okazaki N, Kametani Y, Murakami H, Takaba Y, Ishikawa Y, Nigorikawa K, Hazeki O (2009) Specific role of phosphoinositide 3-kinase p110alpha in the regulation of phagocytosis and pinocytosis in macrophages. *Biochem J* 423:99–108.

(Accepted 19 December 2012)  
(Available online 29 December 2012)

## 3.2 Manuskript II

### 3.2.1 Zusammenfassung

#### **Phosphoinositide 3-kinase $\gamma$ restrains neurotoxic effects of microglia after transitory focal cerebral ischemia**

Caroline Schmidt, Christiane Frahm, Nadine Schneble, Jörg P. Müller, Michael Brodhun, Irene Franco, Otto W. Witte, Emilio Hirsch, Reinhard Wetzker, Reinhard Bauer

*Molecular Neurobiology (2015, accepted)*

Cerebrale Ischämie und damit verbundene inflammatorische Reaktionen im ZNS induzieren degenerative Prozesse und führen zur Schädigung neuronaler Strukturen. Während der Pathogenese des Schlaganfalls führen Defizite der Glucose- und Sauerstoffversorgung im Gehirn zu Entzündungsreaktionen und zur Ausbreitung des Infarkts.

Mikrogliazellen reagieren auf Sauerstoff-Glucose-Mangel mit Aktivierung und nachgeschalteten immunologischen Funktionen. Dabei gilt PI3K $\gamma$  als wichtiger Mediator, welcher Lipidkinase-abhängig und -unabhängig Mikrogliafunktionen steuert.

Im MCAO Modell an Wildtyp, PI3K $\gamma$  *knockout* und PI3K $\gamma$  *knockin* (*kinase dead*) Mäusen und primären Mikrogliazellen sollte die Rolle des Signalproteins nach cerebraler Ischämie *in vivo* und *in vitro* untersucht werden. *In vivo* Daten zeigten eine deutliche Vergrößerung der Infarktregion in PI3K $\gamma$  *knockout* Mäusen, wohingegen die Expansion des Infarkts in Wildtyp und PI3K $\gamma$  *knockin* Mäusen deutlich reduziert war. *In vivo* Experimente zur Phagozytose bestätigten zudem, dass PI3K $\gamma$  *knockout* Mikroglia eine verminderte Aufnahme GFP-markierter *E.coli* unter Sauerstoff-Glucose-Entzug zeigten. Es zeigte sich in weiteren Studien, dass PI3K $\gamma$  Lipidkinase-unabhängig über Interaktion mit PDE3B den cAMP Spiegel in Mikrogliazellen nach cerebraler Ischämie reguliert. PI3K $\gamma$  übt einen supprimierenden Effekt auf cAMP aus und führt somit in Wildtyp und PI3K $\gamma$  *knockin* zur Induktion immunologischer Funktionen. Die schnelle Elimination geschädigten Gewebes durch Phagozytose, führt zur Reduktion des Infarkts in Wildtyp und PI3K $\gamma$  *knockin* Mäusen und zur Induktion von Regenerationsprozessen.

## 3.2.2 Manuskript II

*Author's personal copy*Mol Neurobiol  
DOI 10.1007/s12035-015-9472-z

## Phosphoinositide 3-Kinase $\gamma$ Restrains Neurotoxic Effects of Microglia After Focal Brain Ischemia

Caroline Schmidt<sup>1</sup> · Christiane Frahm<sup>2</sup> · Nadine Schneble<sup>1</sup> · Jörg P. Müller<sup>1</sup> · Michael Brodhun<sup>3</sup> · Irene Franco<sup>4</sup> · Otto W. Witte<sup>2</sup> · Emilio Hirsch<sup>4</sup> · Reinhard Wetzker<sup>1</sup> · Reinhard Bauer<sup>1</sup>

Received: 21 May 2015 / Accepted: 1 October 2015  
© Springer Science+Business Media New York 2015

**Abstract** Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) is linked to neuroinflammation and phagocytosis. This study was conducted to elucidate conjectural differences of lipid kinase-dependent and kinase-independent functions of PI3K $\gamma$  in the evolution of brain damage induced by focal cerebral ischemia/reperfusion. Therefore, PI3K $\gamma$  wild-type, knockout, and kinase-dead mice were subjected to middle cerebral artery occlusion followed by reperfusion. Tissue damage and cellular composition were assessed by immunohistochemical stainings. In addition, microglial cells derived from respective mouse genotypes were used for analysis of PI3K $\gamma$  effects on phagocytic activity, matrix metalloproteinase-9 release, and cAMP content under conditions of oxygen/glucose deprivation and recovery. Brain infarction was more pronounced in PI3K $\gamma$ -knockout mice compared to wild-type and kinase-dead mice 48 h after reperfusion. Immunohistochemical analyses revealed a reduced amount of galectin-3/MAC-2-positive microglial cells indicating that activated phagocytosis was reduced in ischemic brains of knockout mice. Cell culture studies disclosed enhanced metalloproteinase-9 secretion in

supernatants derived from microglia of PI3K $\gamma$ -deficient mice after 2-h oxygen/glucose deprivation and 48-h recovery. Furthermore, PI3K $\gamma$ -deficient microglial cells showed a failed phagocytic activation throughout the observed recovery period. Lastly, PI3K $\gamma$ -deficient microglia exhibited strongly increased cAMP levels in comparison with wild-type microglia or cells expressing kinase-dead PI3K $\gamma$  after oxygen/glucose deprivation and recovery. Our data suggest PI3K $\gamma$  kinase activity-independent control of cAMP phosphodiesterase as a crucial mediator of microglial cAMP regulation, MMP-9 expression, and phagocytic activity following focal brain ischemia/recirculation. The suppressive effect of PI3K $\gamma$  on cAMP levels appears critical for the restriction of ischemia-induced immune cell functions and in turn tissue damage.

**Keywords** MCAO · PI3K $\gamma$  · Microglial cells · Neuroinflammation

### Introduction

Brain ischemia causes both immediate and delayed cell death and is accompanied by a robust inflammatory response that can exacerbate injury during reperfusion. Recent evidence suggests that elements of the immune system are intimately involved in all stages of the ischemic cascade, from the acute intravascular events triggered by the interruption of the blood supply to the parenchymal processes leading to brain damage and the ensuing tissue repair [1]. Activation of ischemia-induced inflammation is mainly driven by “danger signals” released by dying and dead cells [2]. Whereas the progress of tissue damage after brain ischemia is forced by extracellular matrix metalloproteinase (MMP) activation [3, 4], phagocytic removal of dying cells and tissue debris appears to be important for resolution of inflammation and tissue repair [5, 6].

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s12035-015-9472-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Reinhard Bauer  
reinhard.bauer@med.uni-jena.de

<sup>1</sup> Institute of Molecular Cell Biology, Center for Molecular Biomedicine, Jena University Hospital, Friedrich Schiller University, Hans-Knöll-Strasse 2, D-07745 Jena, Germany

<sup>2</sup> Department of Neurology, Jena University Hospital, Jena, Germany

<sup>3</sup> Institute of Pathology, HELIOS Klinikum, Erfurt, Germany

<sup>4</sup> Department of Genetics, Biology, Biochemistry and Molecular Biotechnology Center, University of Torino, Torino, Italy



Microglial cells as the main cell population of resident immune-competent cells in the CNS are activated early after ischemia, preceding the invasion of blood-born immune cells [7]. Activation of microglia is normally strictly controlled by mechanisms involving neuronal–glial communication [8]. Furthermore, microglial activation in cortical tissue appears to be a general response to metabolic stress [9] associated with protein synthesis inhibition [10] at no detectable cortical damage [11]. Therefore, microglia activation is a key factor in the defense of neural parenchyma against various injuries, including brain ischemia [12]. Ischemic stroke has been shown as a powerful stimulus that disables the endogenous inhibitory signaling and triggers pronounced microglial activation [13]. Once activated, microglia exhibit a spectrum of phenotypes and functions to either exacerbate ischemic injury or to induce repair and regeneration—depending on different molecular signals received by the microglial receptors [14].

A wide variety of partly opposing responses have been described for activated microglia and associated with stroke pathophysiology; however, underlying signal transduction pathways are hitherto poorly characterized [15].

Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) was originally characterized as a signaling protein mediating G protein-coupled receptor stimulation by its enzymatic activity to produce phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate for downstream protein kinase B/Akt activation [16–18]. Subsequent studies of PI3K $\gamma$ -deficient mice revealed impaired respiratory burst and motility of peripheral leukocytes indicating a major regulatory function of this signaling protein in immune cells [19]. Unexpectedly, our investigations in heart revealed an intimate interplay of the PI3K $\gamma$  with the cAMP-signaling pathway. A first study revealed that PI3K $\gamma$  attenuates the cAMP/PKA pathway by working as an activator of cardiomyocytic phosphodiesterases, which hydrolyze cAMP to 5'-AMP [20]. Recently, we have disclosed the signaling protein PI3K $\gamma$  as a key mediator of microglial cAMP signaling. This pathway has been found responsible for LPS-induced microglial MMP-9 production with subsequent blood–brain barrier (BBB) deterioration and phagocytic control [21, 22]. A previous report revealed that PI3K $\gamma$  plays a significant role in ischemia/reperfusion-induced brain damage [23] without consideration of differences in its intracellular signaling performance.

Aim of this study was to elucidate conjectural differences of lipid kinase-dependent and kinase-independent functions of PI3K $\gamma$  in the involvement of brain damage induced by focal cerebral ischemia/reperfusion. We hypothesized a specific role of PI3K $\gamma$  in microglial cAMP/PKA signaling on their inflammatory response in brain ischemia/reperfusion. Therefore, we used PI3K $\gamma$  knockout mice and derived microglial cell with complete loss of PI3K $\gamma$  and compared the respective functional and structural consequences after focal brain ischemia with mice and derived microglial cells with deficient PI3K $\gamma$ /AKT signaling by loss of lipid kinase activity induced by

targeted point mutation [20] but preserved cAMP/PKA signaling. Our data indicate that PI3K $\gamma$  deficiency enhances the extent of brain damage during a later stage of acute recovery, likely mediated by aberrant microglial activity. Corroborating the *in vivo* analyses, investigations with primary microglial cells identified the suppressive effect of PI3K $\gamma$  on cAMP signaling on MMP-9 release and reinforced phagocytosis as essential for ameliorating neuroinflammatory responses and improved brain tissue survival.

## Materials and Methods

Experiments were approved by the committee of the Thuringian State Government on Animal Research and performed according to the Protection of Animals Act of the Federal Republic of Germany. The animals were treated in accordance with the declaration of Helsinki and the guiding principles in the care and use of animals. Efforts were made to reduce the number of animals used and their suffering. All surgeries were performed under appropriate anesthesia (isoflurane).

### Animals

Male 3-month-old PI3K $\gamma$  knockout mice (PI3K $\gamma^{-/-}$ ) [19] and PI3K $\gamma$  kinase-dead mice (PI3K $\gamma^{KD/KD}$ ; mice carrying a targeted point mutation in the PI3K $\gamma$  gene causing loss of lipid kinase activity) [20] were on the C57BL/6J background for more than ten generations. Consequently, age-matched C57BL/6 mice were used as controls. The animals were maintained with 12-h light and dark cycles with free access to food and water. Ambient temperature was  $29 \pm 1$  °C during the whole experimental period.

### Bone Marrow Transplantation

Six- to 8-week-old recipient mice (either wild-type or PI3K $\gamma^{-/-}$  mice) underwent a lethal total body irradiation (1000 Rad). Freshly isolated total host bone marrow cells (derived from the appropriate genotype as indicated in the figure legends) were then injected into the lateral tail vein of syngeneic recipient mice ( $5 \times 10^6$  cells per mouse) 24 h after irradiation. Mice were maintained in an isolator, fed irradiation-sterilized chow, and allowed 4–6 weeks of recovery before surgery.

### Induction of Transient Focal Brain Ischemia

Animals were anesthetized with 2.5 % isoflurane for induction and 1.5 % isoflurane for maintenance in 70/30 % nitrous oxide/oxygen administered by mask. Rectal temperature was maintained at 36.5 to 37 °C with a feedback-controlled heating blanket. Focal brain ischemia was induced by transient occlusion of the middle cerebral artery (MCA) using

the intraluminal filament technique [24]. The right common carotid artery (CCA), the external carotid artery (ECA), and the internal carotid artery (ICA) were dissected from surrounding tissue. A 7–0 nylon monofilament (70SPRe, Doccol Corp, USA) was inserted into the ICA (11 mm) for 45 min to occlude the MCA. Operation time per animal did not exceed 15 min. The intraluminal suture was left in situ for 45 min. Then, animals were reanesthetized, and the occluding monofilament was withdrawn to allow reperfusion. Sham animals underwent the same surgical procedure as the treatment group, except that occlusion of the middle cerebral artery was omitted. Animals were allowed to survive for 6 h (survival rate 100 % in all genotypes tested), 12 h (survival rate 100 % in all genotypes tested) or 48 h (survival rate of wild-type mice 10/12, PI3K $\gamma^{-/-}$  mice 10/11, PI3K $\gamma^{KD/KD}$ ; 11/12), respectively. Immediately after recovery from anesthesia, and 24 and 48 h later, neurological deficits were scored in order to verify correct MCAO induction by a modified Bederson score [25] (scoring system: 0, no deficit; 1, forelimb flexion; 2, unidirectional circling; 3, longitudinal spinning; 4, no movement). Mice were excluded from analysis when subarachnoid hemorrhage was macroscopically observed during brain harvesting. No difference in exclusion rates between the groups was observed.

### Assessment of Infarct Volume

Infarct volume was determined as described previously [26]. Briefly, brains were removed at various reperfusion times (6, 12, 48 h). Therefore, mice were deeply anesthetized and perfused with 4 % paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffer after rinsing with PBS by cardiac puncture via the left ventricle. Brains were removed immediately after fixation and postfixed for 5 h in 4 % PFA at 4 °C. After cryoprotection in phosphate-buffered saline (PBS) containing 30 % sucrose, brains were frozen in methylbutane at –30 °C and stored at –80 °C. Whole brains were cut by coronal sections at 40  $\mu$ m on a freezing microtome (Microm International GmbH, ThermoScientific, Germany). The slices were immunostained by MAP2 (see below) to visualize the infarctions. Sections were photographed with a digital Olympus DP50 camera. Planimetric measurements (ImageJ software, National Institutes of Health, Bethesda, MD) blinded to the treatment groups were used to calculate lesion volumes, which were corrected for brain edema accordingly.

### Immunohistochemistry

Free-floating sections were treated with Tris-buffered saline containing 10 % normal donkey or goat serum, 1 % BSA, and 0.2 % Triton X-100. Sections were incubated with the desired primary antibody at 4 °C overnight, followed with the associated secondary antibody at 4 °C for 1 h, and visualized by

fluorescence imaging. Control sections were incubated with the blocking solution in the absence of the respective primary antibody. The following primary antibodies were used: mouse anti-MAP2 (1:1000) antibody (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Munich, Germany) for MAP2 staining, goat polyclonal anti-Iba-1 (1:400) antibody (Abcam, Cambridge, UK) for Iba-1 staining and rabbit polyclonal anti-MMP-9 (1:250) antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, USA) for MMP-9, rabbit anti-mouse MAC-2/galectin-3 (1:750) antibody, and rabbit anti-mouse PMN (1:1000) antibody for neutrophil staining. For visualization, the secondary fluorescent isotype-specific antibodies Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 and Alexa Fluor<sup>®</sup> 568 (Molecular Probes, Inc., Eugene, USA) were used. Cell numbers of respective immune-positive cells were counted from every five visual fields derived from sections adjacent to the both sections with the largest infarct size (according to the respective MAP2 staining) obtained from every three animals of each group. Counting was performed by one observer in a blinded fashion. For MAP2 visualization sections were processed by the Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA) using a donkey anti-mouse biotinylated secondary antibody (Dianova, Hamburg, Germany). Finally, immunoreactivity was developed in 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma-Aldrich Chemie GmbH Munich, Germany).

### Cell Culture

Primary microglial cells were isolated from neonatal mouse cerebral cortex of C57BL/6J wild-type (wt), PI3K $\gamma$ -knockout (PI3K $\gamma^{-/-}$ ), and PI3K $\gamma$ -kinase-dead (PI3K $\gamma^{KD/KD}$ ) mice at day 1 after birth (P1). Microglial cells were cultured at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub> in DMEM with high glucose supplemented with 10 % FCS, 1 % penicillin/streptomycin, and 1 % amphotericin B. Co-cultures of microglial cells and astrocytes were incubated for 14 days at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub>. Adherent microglial cells were separated from co-cultures by addition of PBS/EDTA and careful shaking. Purity of microglia culture was >95 %. After harvesting, microglial cells were counted and seeded in 96-well plates (10,000 cells/well) and 6-well plates (300,000 cells/well) for oxygen-glucose-deprivation (OGD) experiments.

### OGD

Primary microglia were seeded in single cell culture dishes (35 mm, 9.4 cm<sup>2</sup>, 300,000 cells/dish) or white 96-well plates and incubated over night at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub> in DMEM high glucose containing 10 % FCS, 1 % penicillin/streptomycin, and 1 % amphotericin B. After becoming adherent, cells were starved 4 h in DMEM medium without FCS. After starvation, the medium was changed to DMEM without glucose, and cells were incubated under hypoxic conditions at 1 % O<sub>2</sub>

for 2 h. After OGD, the medium was replaced by DMEM high glucose, 1 % penicillin/streptomycin, and 1 % amphotericin B, and microglia were incubated at normoxic conditions at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub> for 24 or 48 h (reoxygenation). Thereafter, microglial cells were used for protein lysis, phagocytosis assay, or cAMP assay.

### Gel Zymography

As described previously [21], cells were seeded in 6-well plates and incubated at 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>). Following adherence, cells were starved for 4 h and incubated under OGD conditions for the indicated times. Supernatants were collected and centrifuged (500g, 4 °C, 5 min). Thereafter, 500 µl of supernatant was concentrated using a 30-kDa Amicon Ultra 0.5-mL centrifugal filter (Millipore, Billerica, MA, USA). The whole concentrate was mixed with 5× nonreducing protein sample buffer (1.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 2 % SDS, 50 % glycerol, 0.1 mg/ml bromophenol blue) and loaded to a 8 % polyacrylamide gel containing 0.6 g/l gelatin. Samples were separated at 15-mA constant current, the gels were washed in Triton X-100 (30 min) and in water (30 min), and then incubated in TAB buffer (100 mM Tris HCl, pH 7.8, 30 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.01 % NaN<sub>3</sub>) for 20 h. Thereafter, the gels were stained with 0.25 % Coomassie blue G250 in de-stain buffer (25 % methanol, 7 % acetic acid) [27]. Stained gels were scanned and analyzed by quantitative densitometry using FUJIFILM Multi Gauge Ver.3.0 software (Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokyo, Japan).

### Phagocytosis Assay

Estimation of microglial phagocytic activity has been described previously [22]. Briefly, microglial cells were seeded in single cell culture dishes (35 mm, 9.4 cm<sup>2</sup>, 300,000 cells/dish) and incubated under OGD conditions. At 23 or 47 h of reoxygenation, the phagocytosis assay was performed by using GFP-producing *E. coli*. For this purpose, 40 µl (optical density 10) of the suspended bacteria were added to the microglial cells and incubated for 1 h. Thereafter, cells were harvested, washed, and resuspended in PBS. The phagocytic activity of the cells was measured by flow cytometry using a FACS Canto instrument (BD, Heidelberg, Germany).

### SDS Page and Western Blotting

Monoclonal anti-mouse p110γ antibody was produced in our facility in Jena. Other antibodies were obtained from Cell Signaling Technologies (Danvers, USA; Phospho-CREB, #9198) and Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Munich, Germany; β-Actin #A5441). For quantification of protein expression and phosphorylation under in vitro OGD conditions, microglial cells of equal cell numbers were seeded in single

cell culture dishes (35 mm, 9.4 cm<sup>2</sup>) and incubated under hypoxic conditions for 2 h followed by reoxygenation at 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>) for 24 or 48 h. Thereafter, cells were lysed in 200-µl RIPA lysis buffer composed of 50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) NP-40, 0.5 % (v/v) deoxycholate, 0.1 % (w/v) SDS, 100 µg/ml Pefa-Block, 1 µg/ml Pepstatin, 10 µM sodium orthovanadate, and 1 µg/ml leupeptin. Cell lysates were centrifuged at 13,000g at 4 °C for 20 min, and the supernatants were mixed with 5× protein sample buffer (5 % SDS, 33 % glycerol, 25 % β-mercaptoethanol) and heated to 95 °C for 5 min. Protein samples were separated by SDS-PAGE using 10 % PAGE-gels, transferred to a polyvinylidene fluoride membrane and developed with the indicated antibodies followed by enhanced chemiluminescence reaction.

### cAMP Assay

Microglial cells were seeded in 96-well clear bottom plates and incubated under OGD conditions followed by reoxygenation. cAMP was measured following the manufactures protocol (Promega, cAMP GloAssayKit).

### Statistical Analysis

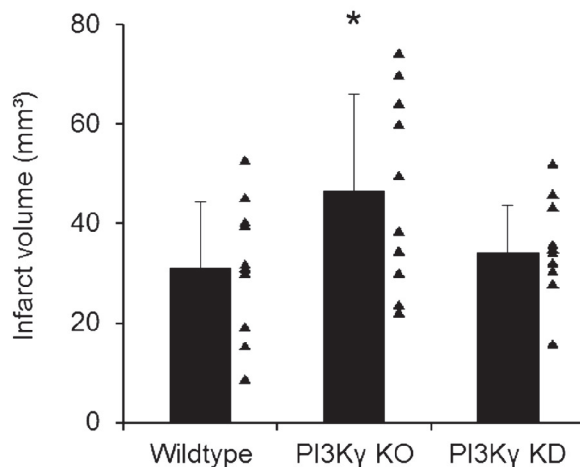
Data are reported as means±SD, if not otherwise indicated. Comparisons between groups were made with one-way or two-way analysis of variance or Mann-Whitney rank sum test, if appropriate. Post hoc comparisons were made with the Holm-Sidak test. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

## Results

### PI3Kγ Deficiency Provokes Maturation of Enlarged Brain Infarction

Evaluation of infarct size after temporary focal brain ischemia by MCAO revealed more pronounced enlargement of brain infarction and neurologic deficit score in PI3Kγ<sup>-/-</sup> mice compared to wild-type mice 48 h after reperfusion ( $p < 0.05$ , Fig. 1, Table 1). Early infarct demarcation (6 and 12 h after reperfusion) was similar in both genotypes (Fig. 2a, b). In order to assess the causal impact of specific PI3Kγ signaling reactions on this phenotype, we also studied the response of knock-in mice expressing lipid kinase-dead PI3Kγ (PI3Kγ<sup>KD/KD</sup>). Infarct size after temporary MCAO and 48-h recirculation was similar in PI3Kγ<sup>KD/KD</sup> and wild-type mice indicating that PI3Kγ inhibits enlargement of infarct size not through its catalytic but through its scaffolding function. In addition, differences shown in infarct volume were not caused by differences in vascular anatomy between wild-type mice and mutants under consideration (Fig. 1 Suppl., Fig. 2 Suppl.).





**Fig. 1** PI3K $\gamma$  deficiency (PI3K $\gamma$  KO) enhances infarct volume 48 h after temporary (45 min) MCAO (values are means $\pm$ SD,  $n=10$ –12 per group;  $*p<0.05$ , \*significant difference to wild-type mice; triangles indicate the individual values of infarct size; one-way ANOVA, followed by Holm–Sidak test for post hoc multiple comparisons)

Since PI3K $\gamma$  controls multiple functions of hematopoietic cells including cell migration [28] and invasion of blood-born leukocytes into the injured brain tissue, we checked for polymorphonuclear leukocytes (PMN) infiltration 48 h after focal brain ischemia. We found a marked increase of invaded PMN in the infarct core regions, compared to corresponding peri-infarct areas (Table 2). Importantly, PI3K $\gamma^{-/-}$  mice exhibited a reduced amount of PMN invasion as compared to wild-type mice, making the contribution of PMN to the increased infarction in PI3K $\gamma^{-/-}$  mice unlikely. PI3K $\gamma^{KD/KD}$  mice exhibited similar PMN accumulation in the infarct core as seen in PI3K $\gamma^{-/-}$  mice.

To further elucidate the potential contribution of PI3K $\gamma$  in invading leukocytes to infarct progression, we determined infarct size 48 h after MCAO in the bone marrow chimeras. Intriguingly, PI3K $\gamma^{-/-}$  mice transplanted with bone marrow harvested from wild-type mice developed enlarged brain infarctions compared to wild-type mice transplanted with PI3K $\gamma^{-/-}$  bone marrow (Fig. 2c). These data indicate that the increased damage seen in PI3K $\gamma^{-/-}$  mice following MCAO injury occurred independently of its role in bone-marrow-derived hematopoietic cells.

We therefore sought for another cellular basis and potential molecular mediators of the destructive processes involved in

the discovered PI3K $\gamma$ -dependent ischemic brain damage. We considered the contribution of brain-resident microglial cells because recent own findings indicated PI3K $\gamma$  as a crucial mediator of microglial cell activation, MMP expression, and subsequent BBB deterioration in the development of sepsis-induced brain damage [21]. Indeed, IHC evaluation of brain slices revealed a distinct immunoreactivity for MMP-9 in Iba-1-positive cells (a marker of microglial cells), suggesting expression of this proteinase in activated microglial cells within the ischemic core (Fig. 3).

### PI3K $\gamma$ Deficiency Enhances Microglial cAMP Level After OGD/Reoxygenation Challenge

Our recent reports identified negative control of cAMP signaling as a prominent lipid kinase-independent activity of PI3K $\gamma$  in resting and activated microglial cells [21, 22]. We used oxygen-glucose deprivation (OGD) to mimic in vitro conditions in the infarcted tissue. As shown in Fig. 4a, PI3K $\gamma$ -deficient microglia exhibited strongly increased cAMP in comparison with wild-type microglia or cells expressing PI3K $\gamma^{KD/KD}$ . This effect was further enhanced early after OGD/reoxygenation challenge. The missing response of intracellular cAMP content in wild type as well as PI3K $\gamma^{KD/KD}$  microglial cells owing to OGD/reoxygenation challenge was accompanied by PI3K $\gamma$  upregulation (Fig. 4b) indicating a PI3K $\gamma$ -related negative control of cAMP signaling to prevent its excessive activation. A similar relation was observed if cAMP levels in these microglial cells were indirectly measured by assaying phosphorylation of the cAMP response element-binding transcription factor CREB (Fig. 4b). These data confirmed the role of PI3K $\gamma$  as a critical mediator of cAMP signaling in microglia in response to OGD/reoxygenation challenge, presumably through a scaffold-dependent stimulation of cAMP phosphodiesterase.

### PI3K $\gamma$ Mediates Microglial MMP-9 Release

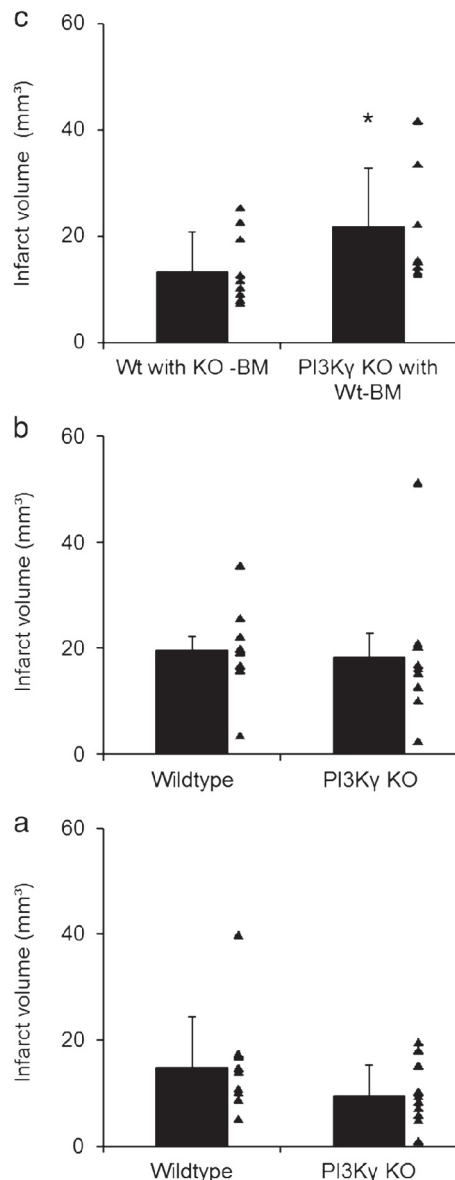
Prompted by the reported in vivo data, further investigations were focused on regulatory functions of PI3K $\gamma$  in microglial cells with potential relevance for infarct enlargement in PI3K $\gamma$ -deficient mice. As shown in Fig. 4b, challenge with OGD induced a marked increase of PI3K $\gamma$  production in primary microglial cells derived from wild-type mice, consistent

**Table 1** Neurological assessment

	Assessment 24 h after MCAO	Assessment 48 h after MCAO
Wt	2.0 $\pm$ 0.8	1.8 $\pm$ 0.6
PI3K $\gamma^{-/-}$	2.3 $\pm$ 0.7	2.7 $\pm$ 0.9 <sup>#</sup>
PI3K $\gamma^{KD/KD}$	1.8 $\pm$ 0.7	1.8 $\pm$ 0.8

Values are given as means $\pm$ SD

<sup>#</sup>,  $*p<0.05$ ; \*significant difference to wild-type (Wt) mice; <sup>#</sup> significant difference to PI3K $\gamma^{KD/KD}$  mice



**Fig. 2** Time-dependent increase of infarct volume 6 (a) and 12 h (b) after temporary (45 min) MCAO. Note that there was no dependency of PI3K $\gamma$  on the extent of infarct volume. c Enhanced infarct volume in chimeras of PI3K $\gamma^{-/-}$ /wild-type bone marrow chimeras in comparison to wild-type/PI3K $\gamma^{-/-}$ -bone marrow (BM) 48 h after temporary (45 min) MCAO (values are means $\pm$ SD, \* $p$ <0.05, \*significant difference between both groups; Mann–Whitney rank sum test;  $n$ =9–10 per group; triangles indicate the individual values of infarct size)

with an involvement in the control of neuroinflammatory reactions of these immune cells. Next, we asked for the role of PI3K $\gamma$  in microglial MMP expression. We determined the activity of microglial MMP-9 release into the supernatant by gelatin zymography. As shown in Fig. 5, 2-h OGD and 48-h recovery caused an enhanced MMP-9 secretion, with the

**Table 2** Number of neutrophils per tissue section for different groups of mice

	Peri-infarct region	Infarct core
Wt	1.6 $\pm$ 1.4	52.7 $\pm$ 9.9*
PI3K $\gamma^{-/-}$	1.6 $\pm$ 1.2	21.1 $\pm$ 11.3*#
PI3K $\gamma^{KD/KD}$	0.9 $\pm$ 0.3	22.1 $\pm$ 6.5*#

Values are given as means $\pm$ SD

#, \* $p$ <0.05; \*significant difference between the brain regions studied;

# significant difference to wild-type (Wt) mice

highest activity in supernatants derived from microglia of PI3K $\gamma$ -deficient mice. Wild type as well as PI3K $\gamma^{KD/KD}$  microglia exhibited only low levels of liberated MMP-9 activity after OGD challenge. This observation indicates that the PI3K $\gamma$  scaffold function—and presumably related effects on cAMP signaling—is important for negative control of OGD-induced MMP-9 production.

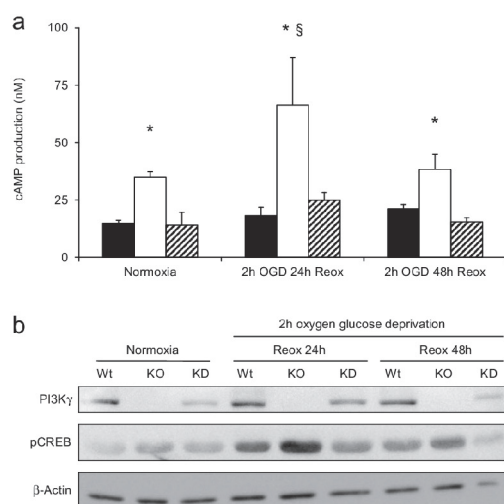
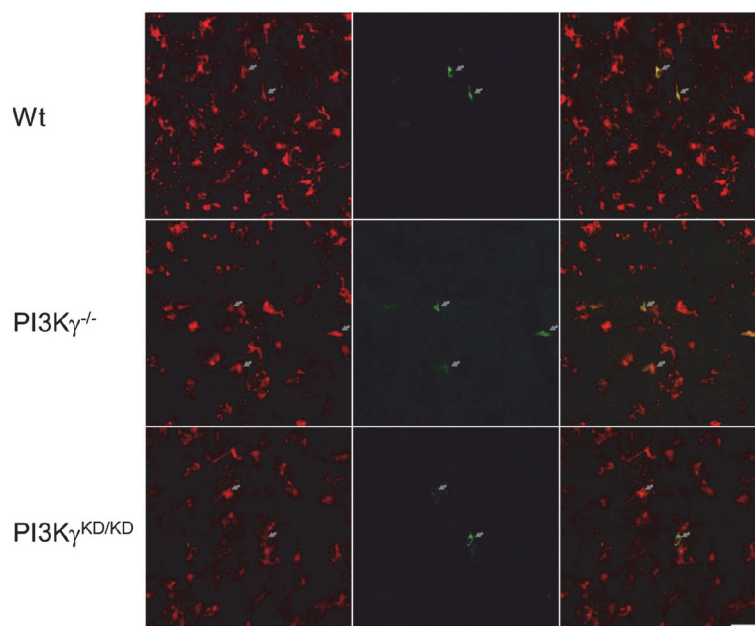
#### PI3K $\gamma$ Deficiency Inhibits Microglial Phagocytic Activity

Considering that microglial phagocytic activity is important for removal of dying cells and debris after focal brain ischemia and recent own data revealing PI3K $\gamma$ -dependent suppression of cAMP signaling as a critical regulatory element of microglial phagocytosis [22], we asked for specific signaling functions of PI3K $\gamma$  involved in brain ischemia/recirculation-induced microglial phagocytosis.

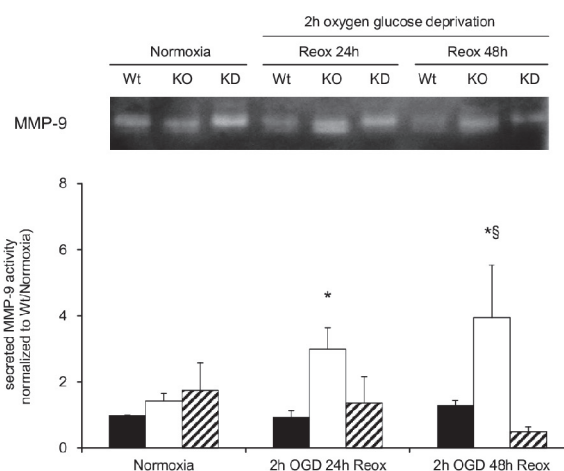
To assess phagocytic activity of microglial cells within the brain infarction after MCAO and 48 h recovery, an IHC analysis of galectin-3/MAC-2 immunoreactivity [29] in Iba-1 positive cells was performed. Intriguingly, a markedly reduced number of Iba-1- and galectin-3/MAC-2 positive cells were found within the peri-infarct regions of PI3K $\gamma$ -deficient mice compared with wild-type and kinase-dead PI3K $\gamma$  knockin-mice (Fig. 6).

Subsequent studies on primary microglial cells subjected to OGD/reoxygenation challenge were consistent with the IHC findings. OGD/reoxygenation caused a marked increase of the phagocytic activity in microglial cells derived from wild-type mice, whereas PI3K $\gamma$ -deficient microglial cells showed a markedly diminished phagocytic activity already under control conditions and a failed phagocytic activation throughout the observed recovery period following OGD (Fig. 7). Microglial cells derived from PI3K $\gamma^{KD/KD}$  mice showed a comparable phagocytic activity as seen in wild-type microglial cells. Furthermore, the OGD/reoxygenation challenge induced a similar phagocytic activation in PI3K $\gamma^{KD/KD}$  microglial cells, compared with wild-type microglial cells. These data clearly indicate a microglial deficiency of phagocytosis activation in the absence of PI3K $\gamma$ , which depends on PI3K $\gamma$  scaffold functions but not on its lipid kinase activity.

**Fig. 3** Detectable cells co-labeling for Iba1 (a marker of microglial cells in red, left panel) and MMP-9 (middle panel, in green) in brain slices derived from wild-type (upper part), PI3K $\gamma$ -deficient (middle part) and PI3K $\gamma$  kinase-dead (lower part) mice (right panel, merged pictures, bar 50  $\mu$ m) (color figure online)



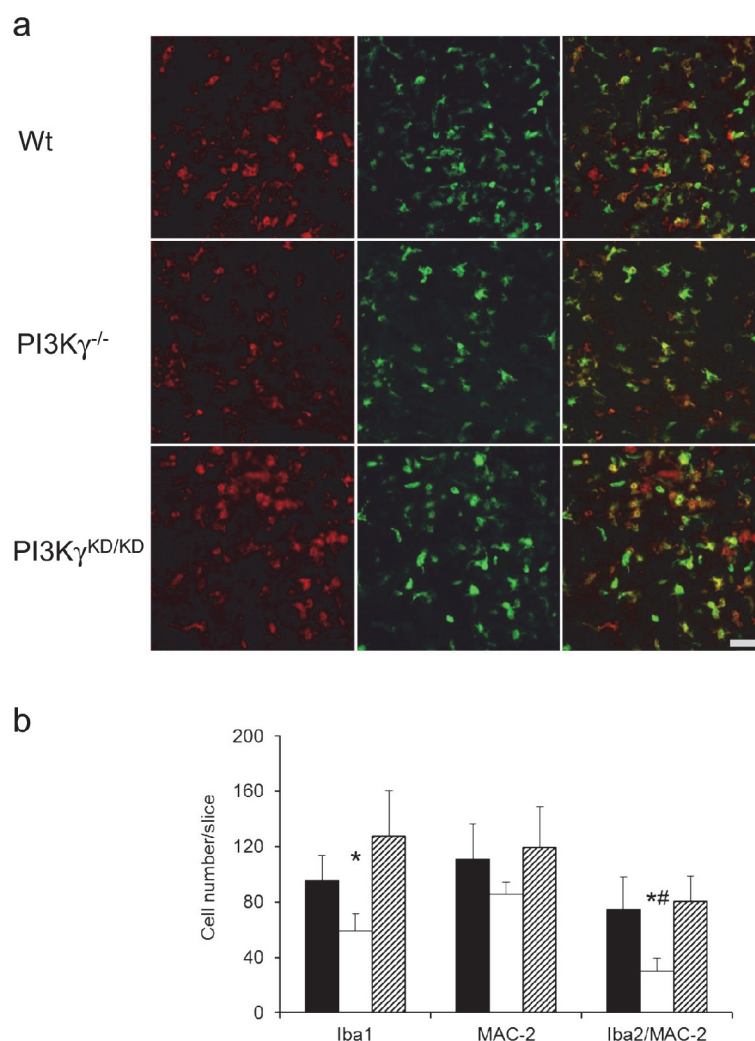
**Fig. 4** Effects of PI3K $\gamma$  on cAMP level in microglia. **a** Increased cAMP levels in primary microglial cells derived from knockout (KO, PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>, open columns) mice compared to those from wild-type (Wt, black columns) and PI3K $\gamma$ -kinase-dead (KD, PI3K $\gamma$ <sup>KD/KD</sup>, hatched columns) mice. Cells were seeded in 6-well plates, starved overnight, administered to oxygen/glucose deficiency (OGD) for 2 h followed by 24 h and 48 h recovery under normoxic/normoglycemic conditions. cAMP levels were evaluated using Promega cAMP GloAssayKit. **b** cAMP-dependent CREB phosphorylation in Wt, KO, and KD primary microglia. CREB phosphorylation has been assayed by Western blotting using specific pCREB antibodies. A representative blot is shown. Values are mean  $\pm$  SEM,  $n=10-12$ . \* $p<0.05$ ; §significant difference to normoxia (two-way ANOVA, treatment effect), \*significant difference between Wt and KO within the respective treatment group (one-way ANOVA followed by Holm-Sidak test for post hoc multiple comparisons)



**Fig. 5** Increased extracellular MMP-9 activity of primary microglial cell-derived knockout (KO, open columns) mice after OGD/reoxygenation challenge, analyzed by zymography of cell culture supernatants (black columns, wild-type (Wt); hatched columns, PI3K $\gamma$  kinase-dead (KD) microglial cells). Cells were seeded in 6-well plates, starved overnight and used as well (Normoxia) or stimulated with OGD for 2 h and incubated in normoxia for 24 h (2 h OGD 24 h Reox) or incubated in normoxia for 48 h (2 h OGD 48 h Reox). Five hundred microliters of cell culture supernatant was concentrated (30 kDa size exclusion) and used for gelatin zymography. Values are mean  $\pm$  SD,  $n=5$  independent experiments derived from five different microglia isolations. \* $p<0.05$ , §significant difference vs. wt within the respective state, §significant difference vs. normoxia (two-way ANOVA, followed by Holm-Sidak test for post hoc multiple comparisons)



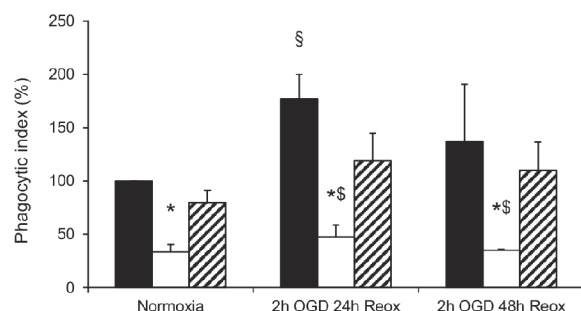
**Fig. 6** Representative pictures (a) of cells co-labeling for Iba1 (a marker of microglial cells in red, left panel) and galectin-3/MAC-2 (middle panel, in green) in brain slices derived from wild-type (upper part), PI3K $\gamma$ -deficient (middle part), and PI3K $\gamma$  kinase-dead (lower part) mice (right panel, merged pictures, bar 50  $\mu$ m). (b) Number of Iba1- and MAC-2/Galectin-3- immunoreactive cells per tissue section for different groups of mice (wild-type, black columns; PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>, open columns; PI3K $\gamma$ <sup>KD/KD</sup>, hatched columns). Values are given as means  $\pm$  SD, \*, #,  $P < 0.05$ , \* significant difference to wild-type (Wt) mice, # significant difference to PI3K $\gamma$ <sup>KD/KD</sup> mice (MAC-2: MAC-2/Galectin-3).



## Discussion

Our comparative investigation of infarct expansion after temporary focal brain ischemia revealed an enhanced time-dependent progression in PI3K $\gamma$ -deficient mice, compared with wild-type mice or mice harboring a lipid kinase-dead version of PI3K $\gamma$ . The time-course of infarct expansion and experiments with bone-marrow-transplanted mice suggests that the genotype-related differences of resulting brain damage are likely related to brain intraparenchymal processes. As underlying reasons, we identified distinct differences in neuroinflammatory control mechanisms presumably leading to altered removal of dying cell and debris as well as to alterations of extracellular proteolysis.

Compliant infarct sizes in wild-type and PI3K $\gamma$ -deficient mice early (6 and 12 h) after recirculation confirm our findings that differences in infarct volume were not caused by differences in vascular anatomy between WT and KO mice (Figs. 1, 2 Suppl.) and verified previous results [23]. Furthermore, we document an enhanced enlargement in infarct size 48 h after recirculation. The latter finding contradicts published results from Jin et al. who showed reduced ischemia/reperfusion-induced BBB disruption and brain damage in PI3K $\gamma$ -deficient mice [23]. Conclusions for the reasons of discrepancy between both studies cannot be drawn from this study. However, in the previous report, the documented enhanced BBB disturbance and associated brain damage in wild-type mice resulted from a longer-lasting period of focal



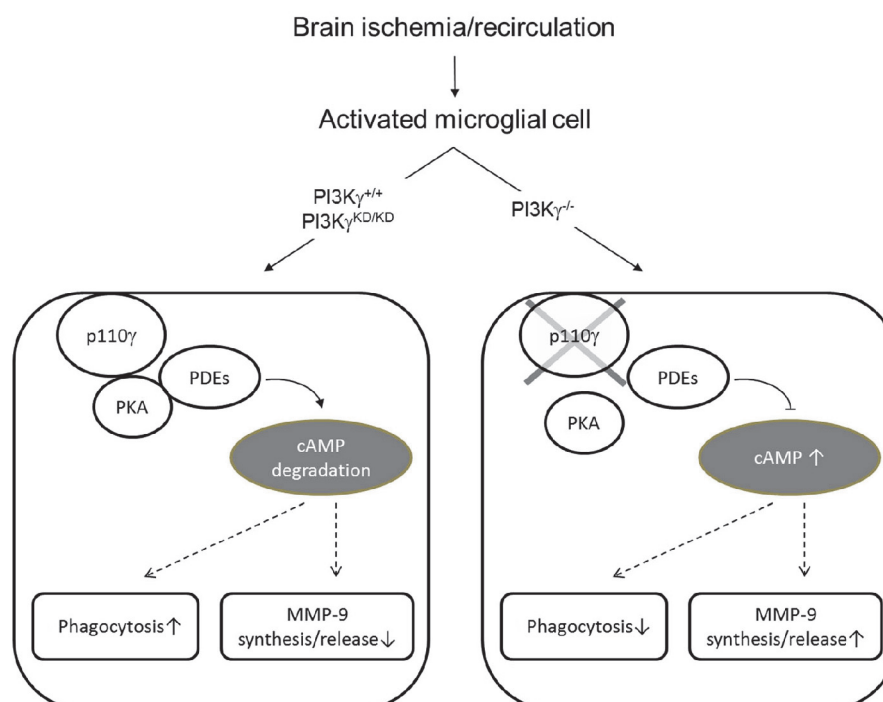
**Fig. 7** Reduced phagocytic activity in PI3K $\gamma$ -deficient microglial cells (open columns) with missing activation after OGD/reoxygenation challenge (black columns, wild type; hatched columns, PI3K $\gamma$  kinase-dead microglial cells). Cells were seeded in 6-well plates, starved for 4 h and used as well (Normoxia) or stimulated with OGD for 2 h and incubated in normoxia for 24 h (2 h OGD 24 h Reox) or incubated in normoxia for 48 h (2 h OGD 48 h Reox). To assay phagocytic activity, a suspension of GFP-producing *E. coli* cells (40  $\mu$ l) was added and incubated together for the last 60 min, respectively. Values are mean  $\pm$  SD,  $n=4$  independent experiments derived from four different microglia isolations. \* $p<0.05$ , \*significant difference vs. wt within the respective state, §significant difference vs. KD within the respective state, §significant difference vs. normoxia (two-way ANOVA, followed by Holm–Sidak test for post hoc multiple comparisons)

ischemia (1 h) and occurred already earlier (24 h) after recirculation. In contrast, our data showed that the enhanced enlargement of infarct size in KO mice was detectable clearly only at a later stage (48 h) of infarct maturation suggesting different underlying mechanisms. Indeed, the authors of the previous study claimed a markedly enhanced PMN infiltration into the ischemic area of wild-type mice as the main source for increased MMP-9 secretion and ROS production and as the relevant executors for enlarged brain tissue damage. Our data clearly show that after a shorter period of brain ischemia with probably reduced BBB disturbance [30] an anticipated markedly increased PMN accumulation occurred in wild-type mice within the ischemic core but was associated with smaller infarct size. In contrast, KO mice with enlarged infarct size exhibited a reduced PMN accumulation (Table 2). These findings suggest that PMN invasion is unlikely to play a decisive role for PI3K $\gamma$ -dependent differences in infarct maturation during later stages of recirculation after focal brain ischemia. This viewpoint is supported by our findings in chimeras harboring PMN (and other leukocytes) with opposing genotype in respect to the host organism including residing microglial cells with corresponding alterations in infarct size 48 h after recirculation (Fig. 2c).

Consequently, we sought for alternative cellular components which may be causally involved in PI3K $\gamma$ -dependent modification of infarct maturation. Our recent studies revealed

that major inflammatory functions of activated microglial cells are markedly controlled by PI3K $\gamma$ . We were able to identify PI3K $\gamma$  as a key mediator of microglial cAMP signaling responsible for LPS-induced microglial MMP-9 production with subsequent BBB deterioration and phagocytic control [21, 22]. There is likewise compelling evidence that cAMP serves as a second messenger for a variety of immunoregulatory and inflammatory responses in microglial cells after transient brain ischemia by a wide range of external stimuli including adrenergic activation of microglial cells via  $\beta$ -adrenergic stimulation [8]. Transient brain ischemia is accompanied by pronounced extracellular norepinephrine release [31, 32] suggesting that adrenergic pathways may contribute to microglial activation early after brain ischemia via cAMP-mediated signaling. Sustained modulation of microglial cAMP signaling during formation of secondary ischemic brain injury is mainly driven by ATP released from damaged cells, being a universal “danger” signal as well as its degrading products formed by numerous endonucleotidases also acting as signaling molecules [33]. This is accompanied by pronounced upregulation of different G protein-coupled purinergic receptors in activated microglia with stimulating as well as inhibitory effects on membrane-bound adenylate cyclase activity affecting intracellular cAMP content [34, 35]. However, intracellular control of cAMP signaling in activated microglial cells after brain ischemia remained widely unknown. The herein used experimental approach revealed that the scaffold function of PI3K $\gamma$  is responsible to prevent microglial cAMP upregulation after ischemic conditions (Fig. 8, see below). The time course of infarct size enlargement in the current study suggests that the genotype-related differences in brain damage may likewise induce brain intraparenchymal processes in response to PI3K $\gamma$ -dependent neuroinflammatory activation of microglial cells via modulated cAMP signaling, leading to varying extracellular matrix decompaction by MMP-9 secretion and removal of dying cells and cell debris by phagocytosis.

Previous reports showed that MMP-9 expression and activity after brain ischemia are induced first in reactive microglia [36] and contribute, among other factors, to infarct extent [37, 38]. Indeed, a pathogenetic role of microglial MMP-9 release is well-defined. MMP-9 acts as executing protease for degrading matrix substrates and interrupting cell–cell or cell–matrix homeostatic interactions, which may directly trigger anoikis-like neuronal cell death by interrupting cell–matrix survival signaling [39] and may further disturb scar formation as a key process of infarct demarcation for preventing inflammatory spreading into perilesional tissue [40]. Furthermore, it has been shown that upregulation of microglial phagocytic activity occurs rapidly after brain ischemia [41] and represents the predominant phagocytic activity [42] for



**Fig. 8** Schematic representation of PI3K $\gamma$ -dependent microglial responses after transient brain ischemia. Microglial activation appeared early after brain ischemia induced by numerous factors including adrenergic transmitters and ATP released from damaged cells, being a universal danger signal as well as its degrading products formed by endonucleotidases also acting as signaling molecules [33]. Among a multitude of diverse immune-relevant channels and receptors activated microglial cells express different G protein-coupled purinergic receptors with stimulating as well as inhibitory effects on membrane-bound adenylate cyclase activity affecting intracellular cAMP content [34, 35]. Our results indicate a relevant role for PI3K $\gamma$  in controlling microglial cAMP signaling as key functions of the neuroinflammatory response after

transient brain ischemia. The catalytic subunit (p110 $\gamma$ ) of PI3K $\gamma$  anchors protein kinase A through a site in its N-terminal region and thereby provokes a stimulation of phosphodiesterases and cAMP degradation [43]. In turn, the retained cAMP signaling warrant sufficient phagocytotic activity and unaltered MMP production of activated microglial cells after brain ischemia (*left panel*). In contrast, loss of PI3K $\gamma$ 's scaffold function by p110 $\gamma$  knockout resulted in sustained increase of microglial cAMP levels and signaling with accompanied suppression of phagocytotic activity, enhanced MMP-9 release, and enlarged brain infarction (*right panel*). The suppressive effect of PI3K $\gamma$  on cAMP levels appears critical for the restriction of ischemia-induced immune cell functions and in turn tissue damage

removal of released danger signals resulting from dying cells and debris after necrotic cell death. These damaged cells are responsible for infarct enlargement by an overwhelming neuroinflammatory response [1].

Our data reveal for the first time that microglial MMP-9 upregulation and secretion as well as microglial phagocytic activity after focal brain ischemia and recirculation is controlled by PI3K $\gamma$ -dependent cAMP signaling. Our genetic approach suggests that the catalytic subunit p110 $\gamma$  of PI3K $\gamma$  signals through its earlier characterized scaffold function in this context. PI3K $\gamma$  has the capacity to anchor protein kinase A through a site in its N-terminal region thereby mediating stimulation of phosphodiesterases and cAMP degradation [43]. Loss of PI3K $\gamma$  in p110 $\gamma$ -deficient mice impedes formation of this multiprotein complex resulting in enhanced microglial cAMP signaling after OGD/reoxygenation challenge (Fig. 4). Uncoupling of this signal transduction network led to increased microglial MMP-9 release and suppression of

microglial phagocytic activity during a critical period of infarct expansion after temporal focal brain ischemia, which is mainly driven by proinflammatory mechanisms [3].

In conclusion, our findings characterize the lipid kinase-independent scaffold function of PI3K $\gamma$  as a key mediator for controlling the neuroinflammatory response after temporary MCAO in mice. PI3K $\gamma$  serves a protective role in that it suppresses MMP-9 release and reinforces phagocytosis leading to improved brain tissue survival.

**Acknowledgments** The authors acknowledge Mrs. M. Guenther, Mrs. S. Tausch and Mrs. R.-M., Zimmer for skillful technical assistance, and F. D. Bochner, for his collegial editorial review of the manuscript. The study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Grant RTG 1715) and by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF; Grant FKZ 01EO1002; Center for Sepsis Control and Care). C.S. and N.S. are PhD students of the Research Training Group 1715 "Adaptive Stress Responses" Grant RTG 1715 of the DFG, and C.S. was supported in part by the Integrated Research and Treatment



Center, Center for Sepsis Control and Care, Jena University Hospital, Jena, Germany.

**Authorship** C.S. designed and carried out the in vitro studies and analyzed the data. C.F. designed and supervised the animal experiments. N.S. carried out in vitro studies and analyzed the data. J.P.M. supervised the in vitro studies and revised the manuscript. M.B. carried out the immunohistochemical studies and analyzed the data. I.F. carried out the chimeric experiments. O.W.W. contributed to the study design, supervised the animal experiments, and revised the manuscript. E.H. designed and supervised the chimeric experiments. R.W. designed and coordinated the study and revised the manuscript. R.B. designed the study, supervised the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript.

#### Compliance with Ethical Standards

**Conflicts of Interest** Nothing to report.

#### References

- Iadecola C, Anrather J (2011) The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 17(7):796–808
- Kono H, Rock KL (2008) How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 8(4):279–289
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22(9):391–397
- Lo EH (2008) A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med* 14(5):497–500
- Nathan C, Ding A (2010) Nonresolving inflammation. *Cell* 140(6):871–882
- Sieber MW, Jaenisch N, Brehm M, Guenther M, Linnartz-Gerlach B, Neumann H, Witte OW, Frahm C (2013) Attenuated inflammatory response in triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) knock-out mice following stroke. *PLoS ONE* 8(1), e52982
- Jin R, Yang G, Li G (2010) Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol* 87(5):779–789
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91(2):461–553
- Gehrmann J, Mies G, Bonnekoh P, Banati R, Iijima T, Kreutzberg GW, Hossmann KA (1993) Microglial reaction in the rat cerebral cortex induced by cortical spreading depression. *Brain Pathol* 3(1):11–17
- Mies G (1993) Inhibition of protein synthesis during repetitive cortical spreading depression. *J Neurochem* 60(1):360–363
- Nedergaard M, Hansen AJ (1988) Spreading depression is not associated with neuronal injury in the normal brain. *Brain Res* 449(1–2):395–398
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19(8):312–318
- Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S, Gao Y, Chen J (2012) Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke* 43(11):3063–3070
- Patel AR, Ritzel R, McCullough LD, Liu F (2013) Microglia and ischemic stroke: a double-edged sword. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 5(2):73–90
- Biber K, Owens T, Boddeke E (2014) What is microglia neurotoxicity (Not)? *Glia* 62(6):841–854
- Murga C, Laguinge L, Wetzker R, Cuadrado A, Gutkind JS (1998) Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors. A role for alpha and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinase gamma. *J Biol Chem* 273(30):19080–19085
- Stephens LR, Eguinoa A, Erdjument-Bromage H, Lui M, Cooke F, Coadwell J, Smrcka AS, Thelen M, Cadwallader K, Tempst P, Hawkins PT (1997) The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* 89(1):105–114
- Stoyanov B, Volinia S, Hanck T, Rubio I, Loubtchenkov M, Malek D, Stoyanova S, Vanhaesebroeck B, Dhand R, Nurnberg B, Gierschik P, Seedorf K, Hsuan JJ, Waterfield MD, Wetzker R (1995) Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* 269(5224):690–693
- Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, Silengo L, Sozzani S, Mantovani A, Altruda F, Wymann MP (2000) Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* 287(5455):1049–1053
- Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, Marengo S, Russo G, Azzolino O, Rybalkin SD, Silengo L, Altruda F, Wetzker R, Wymann MP, Lembo G, Hirsch E (2004) PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* 118(3):375–387
- Frister A, Schmidt C, Schneble N, Brodhun M, Gonnert FA, Bauer M, Hirsch E, Muller JP, Wetzker R, Bauer R (2014) Phosphoinositide 3-Kinase gamma Affects LPS-Induced Disturbance of Blood–brain Barrier Via Lipid Kinase-Independent Control of cAMP in Microglial Cells. *Neuromol Med* 16(4):704–713
- Schmidt C, Schneble N, Muller JP, Bauer R, Perino A, Marone R, Rybalkin SD, Wymann MP, Hirsch E, Wetzker R (2013) Phosphoinositide 3-kinase gamma mediates microglial phagocytosis via lipid kinase-independent control of cAMP. *Neuroscience* 233:44–53
- Jin R, Song Z, Yu S, Piazza A, Nanda A, Penninger JM, Granger DN, Li G (2011) Phosphatidylinositol-3-kinase gamma plays a central role in blood–brain barrier dysfunction in acute experimental stroke. *Stroke* 42(7):2033–2044
- Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA (1994) Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 265(5180):1883–1885
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H (1986) Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 17(3):472–476
- Popp A, Jaenisch N, Witte OW, Frahm C (2009) Identification of ischemic regions in a rat model of stroke. *PLoS ONE* 4(3), e4764
- del Zoppo GJ, Frankowski H, Gu YH, Osada T, Kanazawa M, Milner R, Wang X, Hosomi N, Mabuchi T, Koziol JA (2012) Microglial cell activation is a source of metalloproteinase generation during hemorrhagic transformation. *J Cereb Blood Flow Metab* 32(5):919–932
- Hawkins PT, Stephens LR (2007) PI3Kgamma is a key regulator of inflammatory responses and cardiovascular homeostasis. *Science* 318(5847):64–66
- Rotshenker S, Reichert F, Gitik M, Haklai R, Elad-Sfadia G, Kloog Y (2008) Galectin-3/MAC-2, Ras and PI3K activate complement receptor-3 and scavenger receptor-AI/II mediated myelin phagocytosis in microglia. *Glia* 56(15):1607–1613
- Chen B, Friedman B, Cheng Q, Tsai P, Schim E, Kleinfeld D, Lyden PD (2009) Severe blood–brain barrier disruption and

- surrounding tissue injury. *Stroke* 40(12):e666–674. doi:10.1161/STROKEAHA.109.551341
31. Globus MY, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD (1989) Direct evidence for acute and massive norepinephrine release in the hippocampus during transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 9(6):892–896
  32. Goyagi T, Nishikawa T, Tobe Y (2011) Neuroprotective effects and suppression of ischemia-induced glutamate elevation by beta1-adrenoreceptor antagonists administered before transient focal ischemia in rats. *J Neurosurg Anesthesiol* 23(2):131–137
  33. Verkhratsky A, Krishtal OA, Burnstock G (2009) Purinoceptors on neuroglia. *Mol Neurobiol* 39(3):190–208
  34. Bianco F, Fumagalli M, Pravettoni E, D'Ambrosi N, Volonte C, Matteoli M, Abbracchio MP, Verderio C (2005) Pathophysiological roles of extracellular nucleotides in glial cells: differential expression of purinergic receptors in resting and activated microglia. *Brain Res Brain Res Rev* 48(2):144–156
  35. Dai SS, Zhou YG (2011) Adenosine 2A receptor: a crucial neuromodulator with bidirectional effect in neuroinflammation and brain injury. *Rev Neurosci* 22(2):231–239
  36. Rivera S, Ogier C, Jourquin J, Timsit S, Szklarczyk AW, Miller K, Gearing AJ, Kaczmarek L, Khrestchatsky M (2002) Gelatinase B and TIMP-1 are regulated in a cell- and time-dependent manner in association with neuronal death and glial reactivity after global forebrain ischemia. *Eur J Neurosci* 15(1):19–32
  37. Asahi M, Asahi K, Jung JC, del Zoppo GJ, Fini ME, Lo EH (2000) Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab* 20(12):1681–1689
  38. Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC (1998) Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke* 29(5):1020–1030
  39. Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA (2002) S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* 297(5584):1186–1190
  40. Burda JE, Sofroniew MV (2014) Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 81(2):229–248
  41. Stoll G, Schroeter M, Jander S, Siebert H, Wollrath A, Kleinschnitz C, Bruck W (2004) Lesion-associated expression of transforming growth factor-beta-2 in the rat nervous system: evidence for down-regulating the phagocytic activity of microglia and macrophages. *Brain Pathol* 14(1):51–58
  42. Schilling M, Besselmann M, Muller M, Strecker JK, Ringelstein EB, Kiefer R (2005) Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: an investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol* 196(2):290–297
  43. Perino A, Ghigo A, Ferrero E, Morello F, Santulli G, Baillie GS, Damilano F, Dunlop AJ, Pawson C, Walser R, Levi R, Altruda F, Silengo L, Langeberg LK, Neubauer G, Heymans S, Lembo G, Wymann MP, Wetzker R, Houslay MD, Iaccarino G, Scott JD, Hirsch E (2011) Integrating cardiac PIP3 and cAMP signaling through a PKA anchoring function of p110gamma. *Mol Cell* 42(1):84–95



### 3.3 Manuskript III

#### 3.3.1 Zusammenfassung

##### **Phosphoinositide 3-Kinase $\gamma$ Affects LPS-induced Disturbance of Blood-Brain Barrier Via Lipid Kinase-Independent Control of cAMP in Microglial Cells**

A. Frister, C. Schmidt, N. Schneble, M. Brodhun, F. A. Gonnert, M. Bauer, E. Hirsch, J.P. Müller, R. Wetzker, R. Bauer

*Neuromolecular Medicine* (2014) ISSN 1535-1084 Dec.16(4):704-13

Die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke durch neurodegenerative Erkrankungen führt zur Invasion und Aktivierung von Immunzellen. Als Konsequenz induzieren diese neuroinflammatorische Reaktionen, die in überschießender Zytokinproduktion und Gewebeschädigung resultieren. Matrixmetalloproteasen (MMP) sind maßgeblich am Prozess der Degradation Extrazellulärer Matrix beteiligt. Ihre abnormale Expression, speziell in aktivierten Mikrogliazellen, führt zur Schädigung bis hin zur Öffnung der Blut-Hirn-Schranke für Pathogene. Mittels verschiedener Maus-Genotypen (Wildtyp, PI3K $\gamma$  *knockout*, PI3K $\gamma$  *knockin (kinase dead)*) wurde im Modell der LPS-induzierten systemischen Inflammation die Funktion der PI3K $\gamma$  untersucht. *In vivo* und *in vitro* Studien identifizieren das Signalprotein als essentiellen Mediator der MMP-Expression in aktivierten Mikrogliazellen und die darauf zurückzuführende Blut-Hirn-Schranken-Störung. Die PI3K $\gamma$  Lipidkinase-Aktivität spielt dabei eine untergeordnete Rolle. Es zeigte sich, dass die Expression von MMP sowohl im Wildtyp, als auch im PI3K $\gamma$  *knockin* ein konstantes Level aufweisen. Unter Verwendung verschiedener Inhibitoren und Aktivatoren des PDE/cAMP/PKA Signalweges konnte erneut die wichtige Bedeutung der Gerüstfunktion von PI3K $\gamma$  nachgewiesen werden. Die Lipidkinase-unabhängige Stimulation der PDE-Aktivität kontrolliert über die regulatorische Funktion von PI3K $\gamma$  den cAMP-Spiegel, der wiederum die Expression der MMP-9 drastisch ansteigen lässt. Diese hohe Aktivität der MMP induziert eine Schädigung der Blut-Hirn-Schranke, wie sie bereits während systemischer Infektionen, wie Sepsis-assoziiierter Enzephalopathie (SAE) nachgewiesen werden konnte. Diese Daten zeigen PI3K $\gamma$  als essentiellen Mediator der LPS-induzierten MMP-Expression und -Aktivierung in Mikrogliazellen.

## 3.3.2. Manuskript III

Neuromol Med  
DOI 10.1007/s12017-014-8320-z

## ORIGINAL PAPER

## Phosphoinositide 3-Kinase $\gamma$ Affects LPS-Induced Disturbance of Blood–Brain Barrier Via Lipid Kinase-Independent Control of cAMP in Microglial Cells

Adrian Frister · Caroline Schmidt · Nadine Schneble · Michael Brodhun · Falk A. Gonnert · Michael Bauer · Emilio Hirsch · Jörg P. Müller · Reinhard Wetzker · Reinhard Bauer

Received: 26 November 2013 / Accepted: 10 July 2014  
© Springer Science+Business Media New York 2014

**Abstract** The breakdown of the blood–brain barrier (BBB) is a key event in the development of sepsis-induced brain damage. BBB opening allows blood-born immune cells to enter the CNS to provoke a neuroinflammatory response. Abnormal expression and activation of matrix metalloproteinases (MMP) was shown to contribute to BBB opening. Using different mouse genotypes in a model of LPS-induced systemic inflammation, our present report reveals phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) as a mediator of BBB deterioration and concomitant generation of MMP by microglia. Unexpectedly, microglia expressing lipid kinase-deficient mutant PI3K $\gamma$  exhibited similar MMP regulation as wild-type cells. Our data suggest kinase-independent control of cAMP phosphodiesterase activity

by PI3K $\gamma$  as a crucial mediator of microglial cell activation, MMP expression and subsequent BBB deterioration. The results identify the suppressive effect of PI3K $\gamma$  on cAMP as a critical mediator of immune cell functions.

**Keywords** PI3K $\gamma$  · PDE · cAMP · Microglia · Matrix metalloproteinase · Blood–brain barrier · Endotoxin · Neuroinflammation

### Introduction

Brain dysfunction is a common but widely neglected accompaniment of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) during the early phase of systemic infection, called sepsis-associated encephalopathy (SAE) (Wilson and Young 2003). SAE is present in up to 70 % of patients with severe septic illness and causes increased morbidity and mortality (Eidelman et al. 1996; Jacob et al. 2011). Blood–brain barrier (BBB) breakdown represents an early key step of SAE pathogenesis starting with macromolecule passage via transendothelial channels of brain microvessels. Subsequently, significant deterioration of brain endothelial tight-junctions allows invasion of blood-born immunocompetent cells and corresponding proinflammatory reinforcement (Nag et al. 2011). Matrix metalloproteinases (MMP) have been described as key mediators of the matrix-degrading processes in the basal lamina of brain endothelial cells leading to the opening of the BBB and subsequent neuroinflammatory tissue damage (Candelario-Jalil et al. 2009).

Whereas the role of endothelial cells in inflammatory deterioration of BBB is well characterized (Banks and Erickson 2010), the impact of other cellular components including pericytes, astrocytes and microglial cells is till

Adrian Frister and Caroline Schmidt have contributed equally to this work.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s12017-014-8320-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Frister · C. Schmidt · N. Schneble · J. P. Müller · R. Wetzker · R. Bauer (✉)  
Institute of Molecular Cell Biology, Jena University Hospital, Friedrich Schiller University, 07745 Jena, Germany  
e-mail: Reinhard.Bauer@med.uni-jena.de

A. Frister · F. A. Gonnert · M. Bauer · R. Bauer  
Integrated Research and Treatment Center, Center for Sepsis Control and Care, Jena University Hospital, Jena, Germany

M. Brodhun  
Department of Pathology, Helios-Klinikum Erfurt, Erfurt, Germany

E. Hirsch  
Molecular Biotechnology Center, University of Torino, 10126 Turin, Italy

now poorly understood. Microglial cells as the brain's resident immune cells are prone to react early on signals of systemic inflammatory responses induced by infection. Ligation of microglial toll-like receptors (TLR) by pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) leads to a multistage activation process that converts the microglia into an activated proinflammatory state (Kettenmann et al. 2011; Lehnardt 2010). These sentinel cells for early neuroinflammatory response are able to release specifically MMP-3 after proinflammatory stimulation leading to BBB opening by cleavage activation of executing MMPs, like MMP-9 (Gurney et al. 2006). However, specific intracellular mechanisms of stimulus-dependent MMP upregulation in microglia are currently largely unknown.

Recently, we described the phosphoinositide 3-kinase species  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) as a major mediator of LPS-induced microglia activation and phagocytosis (Schmidt et al. 2013). PI3K $\gamma$  was originally characterized as a mediator of G protein-coupled receptor agonists, endowed with the enzymatic activity to produce phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate thereby and to subsequently stimulate AKT activity (Murga et al. 1998; Stephens et al. 1997; Stoyanov et al. 1995). Investigation of PI3K $\gamma$ -deficient mice revealed a pronounced depression of the immunogenic reactions of peripheral leukocytes indicating a major regulatory function of this signaling protein in the immune system (Hirsch et al. 2000). Unexpectedly, our subsequent investigations in heart revealed an intimate interplay of the PI3K $\gamma$  with the cAMP-signaling pathway. A first study characterized PI3K $\gamma$  as a stimulator of cAMP phosphodiesterase activity (Patrucco et al. 2004). More recent work explored the physiological relevance of cAMP/PKA-dependent suppression of PI3K $\gamma$  lipid kinase activity in heart (Perino et al. 2011). On the basis of these data, we asked for a possible interplay of cAMP/PKA signaling and PI3K $\gamma$ /AKT signaling in the brain.

The present study was conducted to assess the role of PI3K $\gamma$  in BBB dysfunction elicited by LPS-induced systemic inflammation in mice. Our data reveal PI3K $\gamma$ -dependent control of MMP production by microglia as an important element of LPS-induced BBB opening in mice. Surprisingly, PI3K $\gamma$  lipid kinase activity does not play a role in this process but rather PI3K $\gamma$  mediated regulation of cAMP.

## Experimental Procedures

### Animals, Verification of LPS-Induced SIRS in Mice Mutants

PI3K $\gamma$ -knockout (PI3K $\gamma^{-/-}$ ) (Hirsch et al. 2000) and PI3K $\gamma$  kinase-dead (PI3K $\gamma^{KD/KD}$ ) mice (Patrucco et al.

2004) were on the C57BL/6J background for more than 10 generations. Consequently, age-matched C57BL/6 mice were used as controls. The animals were maintained with 12-h light and dark cycles with free access to food and water. Experiments were approved by the committee of the Thuringian State Government on Animal Research. Mice received lipopolysaccharides (LPS, 10 mg/kg from *Escherichia coli* serotype 055:B5, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Lot #032M4082V) as a single intraperitoneal injection and another group received phosphate-buffered saline (PBS) vehicle as control. Additionally, 500  $\mu$ l of saline was injected subcutaneously to prevent dehydration. Single intraperitoneal LPS injection (10 mg/kg) provoked a (sub)lethal systemic inflammatory response (mortality rate 87–100 %,  $n = 7$ –15 per group) with fast decline of the scored clinical status within the first 12 h after administration, quantified as described (Gonnert et al. 2011). The mice were killed 24 h after LPS administration, and their brains were obtained according to the following processing procedures.

### Evaluation of BBB Permeability by Evan's Blue Leakage

BBB disruption was analyzed by measurement of Evans blue (EB) extravasation into brain tissue as described (Comim et al. 2011). In brief, EB (4 ml/kg of a 2 % solution in PBS) was injected through the tail vein 1 h prior killing. Deeply anaesthetized animals were transcardially perfused with ice-cold PBS (40 ml) either 4 or 24 h after LPS administration. The brains were removed after blood removal, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . One hemisphere was homogenized in trichloroacetic acid (50 %) and centrifuged (10,000 rpm, 20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Supernatant was diluted in three volumes of ethanol. EB was quantified by fluorescence measurement (Tecan Infinite F200, excitation 620 nm, emission 670 nm) and compared to a standard curve. EB concentrations are presented as  $\mu\text{g}$  of EB per g of brain tissue.

### Histology and Immunohistochemistry (IHC)

Twenty-four hours after LPS administration, mice were deeply anesthetized and perfused with 4 % paraformaldehyde in phosphate buffer after rinsing with PBS by cardiac puncture via the left ventricle. Brains were removed immediately after fixation, post-fixed in 4 % paraformaldehyde at  $4^{\circ}\text{C}$  for 1 day, embedded in paraffin and cut into 6- $\mu\text{m}$ -thick sections. For immunohistochemistry, each deparaffinized, slide-mounted tissue section was incubated, after blockade of non-specific binding sites and antigen retrieval (microwave, 750 W, 11 min, 0.01 mol/l citrate buffer, pH 6), with the desired primary antibody in

**Table 1** Primers designed for real-time PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer	References
MMP-2	TGGCAGTGCAATACCTGAAC	CCGTACTTGCCATCCTTCTC	(Nagyoszi et al. 2010)
MMP-3	GTACCAACCTATTCTGGTTGC	CCAGAGAGTTAGATTGGTGGG	(Woo et al. 2008)
MMP-9	ACCACTAAAGGTCGCTCGGATGGTT	AGTACTGCTTGCCAGGAAGACGAA	(Setz et al. 2011)
MMP-13	GGGCTCTGAATGGTTATGACATTC	AGCGCTCAGTCTCTTCACCTCTT	(Guo et al. 2010)
MMP-14	AGGAGACAGAGGTGATCATCATTG	GTCCCATGGCGTCTGAAGA	(Guo et al. 2010)

phosphate-buffered saline (PBS) at 4 °C overnight, followed with the associated secondary antibody at 4 °C for 1 h, and visualized by fluorescence imaging. Control sections were incubated with goat serum in absence of the primary antibody. The following primary antibodies were used: goat polyclonal anti-Iba-1 (1:250) antibody (Abcam, Cambridge, UK) for Iba1 staining and rabbit polyclonal anti-MMP-9 (1:50) antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, USA) for MMP-9 and anti-myeloperoxidase (MPO, dianova, Hamburg, Germany) for neutrophils staining. For visualization, the secondary fluorescent goat anti-mouse isotype-specific antibodies Alexa Fluor® 488 and Alexa Fluor® 568 (Molecular Probes, Inc., Eugene, USA) were used.

#### Cell Culture

Primary microglial cells were isolated from neonatal mouse cerebral cortex of C57BL/6J wild-type (wt), PI3K $\gamma$ -knockout (PI3K $\gamma^{-/-}$ ) and PI3K $\gamma$ -kinase-dead-knockin (PI3K $\gamma^{KD/KD}$ ) mice. Microglial cells were cultured at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub> in DMEM with high glucose supplemented with 10 % FCS, 1 % penicillin/streptomycin and 1 % amphotericin B. Co-cultures of microglial cells and astrocytes were incubated for 14 days at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub>. Adherent microglial cells were separated from co-cultures by addition of PBS/EDTA and careful shaking.

#### Real-Time qPCR

Total RNA was extracted from microglial cells using the RNeasy Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany). RNA was treated with RNase-free DNase I (Fermentas, St. Leon Rot, Germany). After determining RNA concentration with a Nanodrop ND-1000 (Peqlab, Erlangen, Germany) photometer, 0.5 µg of RNA was used for cDNA preparation by First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon Rot, Germany). Real-time qPCR was performed using Maxima SYBR Green/Rox (Fermentas, St. Leon Rot, Germany) and appropriate primers (Table 1). Quantified mRNA was correlated with a normalization factor derived from  $\beta$ -actin, GAPDH and Hprt1.

#### Gel Zymography

Cells were seeded in 6-well plates and incubated at 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>). Following adherence, cells were starved overnight and treated with LPS (100 ng/ml) for the indicated times. Supernatants were collected and centrifuged (500 g, 5 min, 4 °C). Thereafter 500 µl of supernatant were concentrated using a 30 kDa Amicon Ultra-0.5 mL centrifugal filter (Millipore, Billerica, MA, USA). The whole concentrate was mixed with 5× non-reducing protein sample buffer (1.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 2 % SDS, 50 % glycerol, 0.1 mg/ml bromophenol blue) and loaded to a 8 % polyacrylamide gel containing 0.6 g/l gelatin. Samples were separated at 15 mA constant current, the gels were washed in Triton X-100 (2× 30 min), and in water (30 min) and then incubated in TAB buffer (100 mM Tris HCl, pH 7.8, 30 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.01 % NaN<sub>3</sub>) for 20 h. Thereafter the gels were stained with 0.25 % coomassie blue G250 in de-stain buffer (25 % methanol, 7 % acetic acid) (del Zoppo et al. 2012).

Stained gels were scanned and analyzed by quantitative densitometry using FUJIFILM Multi Gauge Ver.3.0 software (Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokyo, Japan). For statistical analysis, values were normalized to the corresponding unstimulated wild-type sample.

#### SDS-PAGE and Western Blotting

Protein expression and phosphorylation was analyzed by Western blotting of cell lysates. Cells were seeded in 6-well plates and incubated at 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>). Following adherence, cells were incubated overnight in DMEM without FCS and treated with agonists and/or inhibitors for indicated time points. Thereafter cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) NP-40, 0.5 % (v/v) sodium deoxycholate, 0.1 % (w/v) SDS, 100 mg/ml Pefa-Block, 1 µg/ml pepstatin, 100 µM sodium vanadate and 1 µg/ml leupeptin. After centrifugation (13,500 g, 20 min, 4 °C), supernatants were mixed with 5× loading buffer (5 % SDS, 33 % glycerol, 25 %  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.1 mg/ml bromophenol blue) and heated to 95 °C for 5 min. Protein samples were separated on a 10 % polyacrylamide gel and transferred to a

polyvinylidenfluorid membrane. After blocking with BSA, proteins were detected with the indicated antibodies followed by incubation with appropriate secondary antibodies, coupled to horseradish peroxidase and by enhanced chemiluminescence reaction and detection using a LAS4000 (Fuji Photo Film Co., Ltd, Tokyo, Japan) camera.

#### cAMP Assay

Microglial cells were seeded in 96-well clear-bottom plates and stimulated with LPS. cAMP was measured using the cAMP GloAssayKit (Promega, Mannheim, Germany) following the manufacturer's protocol.

#### Statistical Analysis

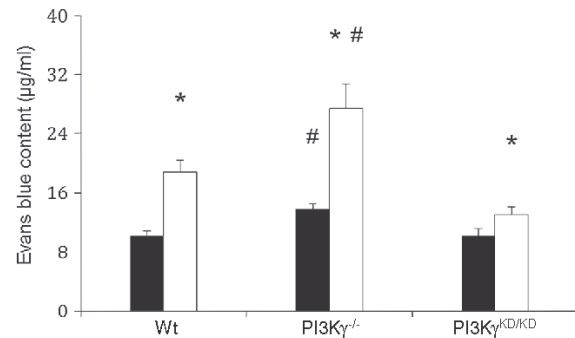
Data are reported as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Comparisons between groups were made with one-way or two-way analysis of variance, if appropriate. If normality test failed, Kruskal–Wallis one-way analysis of variance on ranks was used. Post hoc comparisons were made with the Holm–Sidak test or the Dunn's method was used, if appropriate. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

## Results

### PI3K $\gamma$ -Deficient Mice Display Aggravated BBB Leakage After LPS Induces SIRS

To investigate the role of PI3K $\gamma$  in LPS-induced BBB deterioration, we used PI3K $\gamma$ -deficient mice (PI3K $\gamma^{-/-}$ ) and mice carrying a targeted mutation in the PI3K $\gamma$  gene causing loss of lipid kinase activity (PI3K $\gamma^{KD/KD}$ ). As shown in our previous studies, both genotypes allows assigning the phenotype of the mouse model to either PI3K $\gamma$  lipid kinase activity (Stoyanov et al. 1995) or kinase-independent “scaffold” reactions of the protein like the negative control of cellular cAMP level via stimulation of phosphodiesterases (Patrucco et al. 2004; Perino et al. 2011).

Figure 1 reveals a strongly enhanced BBB leakage in PI3K $\gamma$ -knockout mice (PI3K $\gamma^{-/-}$ ) in comparison with wild-type mice 24 h after LPS treatment, whereas an early BBB opening (4 h after treatment) was similar in both genotypes (Fig. 1 Suppl.). In order to verify the causal impact of specific PI3K $\gamma$  signaling reactions on this phenotype, we also studied the response of lipid kinase-dead mutant mice PI3K $\gamma^{KD/KD}$ . LPS-induced BBB disturbance in PI3K $\gamma^{KD/KD}$  mice was similar as in wild-type mice, and



**Fig. 1** Enhanced Evans blue (EB) extravasation into brain tissue of PI3K $\gamma$ -deficient (PI3K $\gamma^{-/-}$ ) mice 24 h after intraperitoneal LPS (10 mg/kg) administration (open columns) in comparison with wild-type (Wt) and kinase-dead (PI3K $\gamma^{KD/KD}$ ) mice. Values are mean  $\pm$  SEM,  $n = 16$ –17 per group; \* $p < 0.05$ , \*significant differences to control (black columns, values obtained after PBS administration), #significant differences versus Wt, respectively

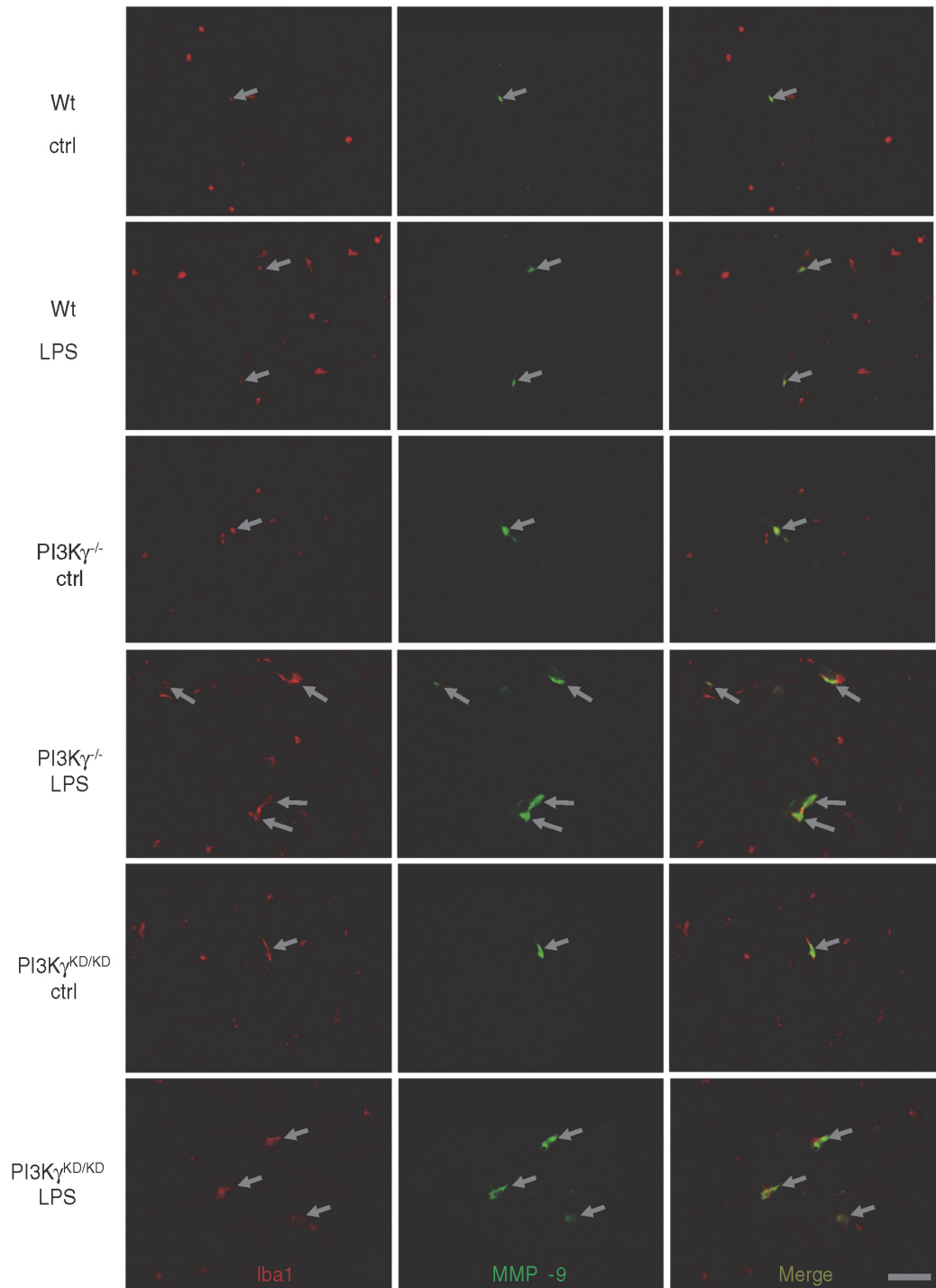
clearly lower than in PI3K $\gamma^{-/-}$  mice. These observations indicated that the loss of the scaffold protein activity of PI3K $\gamma$  exhibited aggravating effects on disturbed BBB integrity in the development of SIRS-induced SAE.

To further explore the *in vivo* findings of aggravated BBB leakage in PI3K $\gamma$ -deficient mice, we sought for a cellular basis and potential molecular mediators of the destructive processes involved in the discovered PI3K $\gamma$ -dependent BBB disturbance following LPS administration. We considered the contribution of resident microglial cells or invaded neutrophils to the LPS-induced BBB deterioration. IHC evaluation of brain slices revealed a distinct immunoreactivity for MMP-9 in Iba-1 positive cells (a marker of microglial cells), which suggests expression of this proteinase in perivascular microglial cells (Fig. 2).

Next, we checked for leukocyte invasion after LPS challenge and found a rather small amount of invaded polymorphonuclear leukocytes (PMN), but a significant increase compared with control conditions (Table 1 Suppl.). Importantly, however, PI3K $\gamma^{-/-}$  mice exhibited a reduced amount of PMN invasion after 24-h LPS stimulation as compared to wild-type and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  mice, making the contribution of PMN to the increased BBB leakage in PI3K $\gamma^{-/-}$  mice unlikely and favoring a relevant role of activated microglial cells.

Together, these data disclose a time-dependent enhancement of LPS-induced BBB disturbance in PI3K $\gamma$ -deficient mice. Comparative investigations of PI3K $\gamma^{-/-}$  and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  mice clearly indicate lipid kinase independence of this phenotype and suggest the known PI3K $\gamma$  scaffold function and potentially concomitant effects on cAMP signaling as a major cause for increased BBB



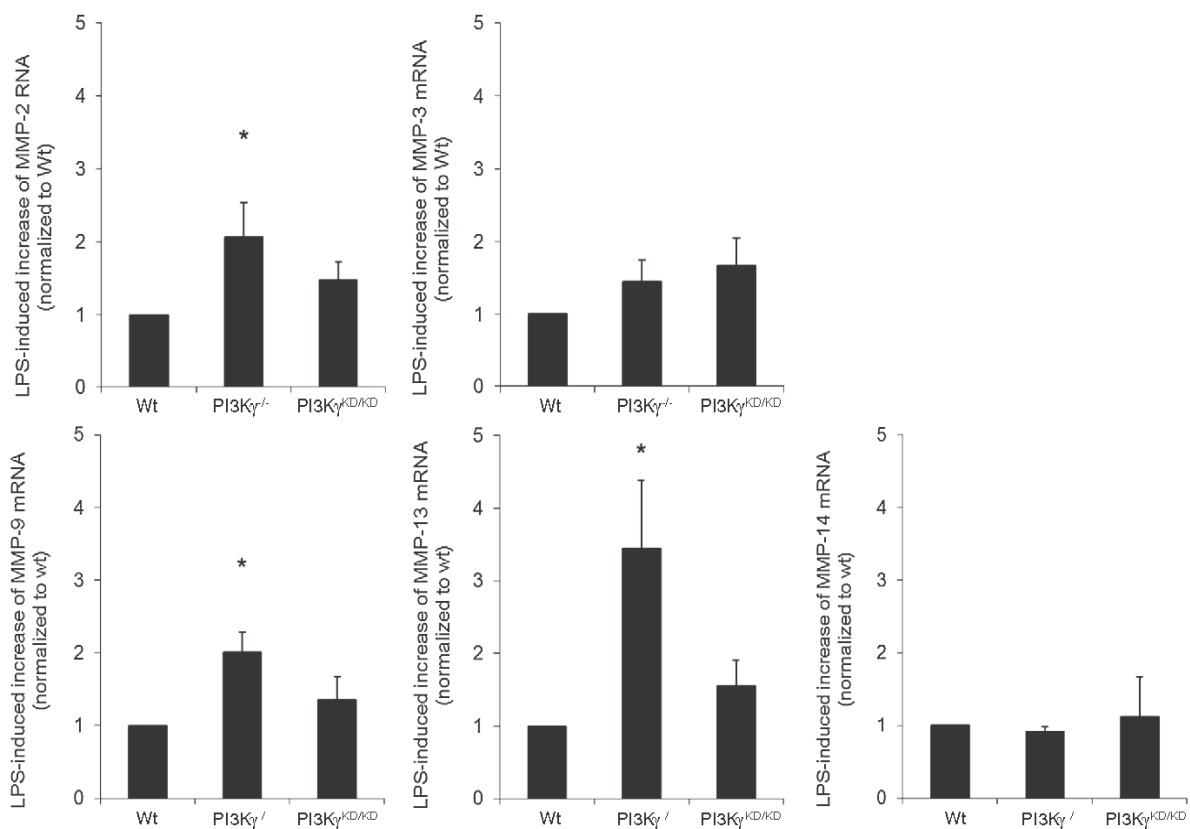


**Fig. 2** Detectable cells colabeling for Iba1 (a marker of microglial cells in red, left panel) and MMP-9 (middle panel, in green) in brain slices derived from untreated mice (ctrl) and 24 h after LPS

administration (LPS) were mainly perivascular located (right panel, merged pictures, bar 50  $\mu$ m) (Color figure online)

opening in PI3K $\gamma$  deficiency. IHC analysis implies MMP production by perivascular microglial cells as a possible cause of the progressive BBB breakdown after LPS

challenge. Hence, enhancement of LPS-induced BBB disturbance in PI3K $\gamma$ -deficient mice may be caused by cAMP-dependent MMP production of microglia.



**Fig. 3** Increase of LPS-induced mRNA expression of MMP-2, MMP-9, and MMP-13 in microglia of PI3K $\gamma^{-/-}$  mice, whereas MMP-3 and MMP-14 mRNA expression remains unaltered. Cells were seeded in 6-well plates, starved overnight and stimulated with LPS (100 ng/ml) for 3 h. After RNA extraction, cDNA was produced and used for real-time qPCR. Quantified mRNA was correlated to

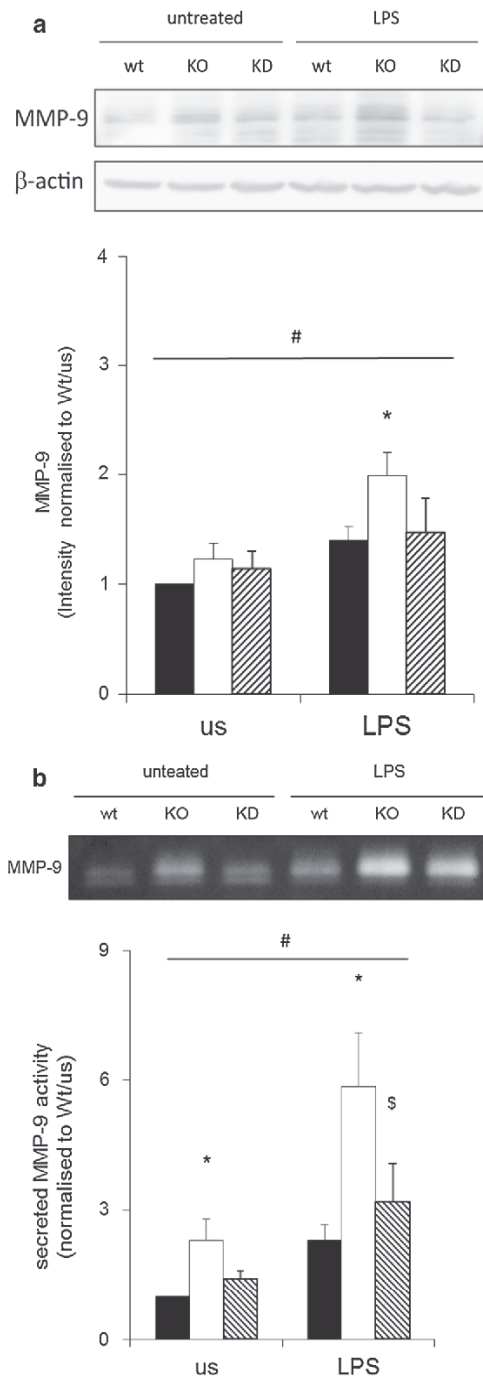
normalization factor. Values are mean + SEM,  $n = 4-7$ . \* $p < 0.05$  significant difference versus wt (one-way ANOVA followed by Holm-Sidak test for post hoc multiple comparisons or one-way ANOVA on ranks followed by Dunn's test for post hoc multiple comparisons, as appropriate)

#### PI3K $\gamma$ Mediates Microglial MMP Production and Release

On the basis of these *in vivo* data, further investigations were focused on regulatory functions of PI3K $\gamma$  in microglial cells. As shown in Fig. 2 Suppl., challenge with LPS induced a marked increase of PI3K $\gamma$  expression in primary microglial cells, consistent with an involvement in the control of inflammatory reactions of these immune cells. Next, we asked for the role of PI3K $\gamma$  in microglial MMP expression. As shown in Fig. 3, LPS stimulation induced an enhanced expression of MMP-2, 9 and 13 mRNA in microglial cells derived from PI3K $\gamma$ -deficient mice, whereas there was no effect on MMP-3 and MMP-14 mRNA expression. Furthermore, there was no significantly increased mRNA expression of any of the analyzed MMPs after LPS stimulation in microglial cells derived from PI3K $\gamma^{KD/KD}$  mice (Fig. 3). Therefore, comparison of the LPS-induced MMP mRNA expression in microglia from wild-type, PI3K $\gamma^{-/-}$  and PI3K $\gamma^{KD/KD}$

mice revealed lipid kinase independency of the PI3K $\gamma$ -dependent effects.

Considering that MMP-9 is attributed to be the major inducible metalloproteinase, which acts on multiple substrates in the extracellular matrix of the abluminal BBB (Yang and Rosenberg 2011), we decided to focus the further investigations of PI3K $\gamma$ -dependent effects on MMP-9. First, we determined the MMP-9 content in microglial cells after LPS stimulation and found enhanced MMP production in PI3K $\gamma$ -deficient microglia compared to wild-type microglia (Fig. 4a). Considering MMP synthesis as inactive zymogens, we determined the activity of microglial MMP-9 release into the supernatant by gelatin zymography. As shown in Fig. 4b, enhanced MMP-9 secretion with the highest activity in supernatants derived from microglia of PI3K $\gamma$ -deficient mice was found under resting conditions. Wild-type and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  microglia exhibited low levels of liberated MMP activity indicating PI3K $\gamma$  scaffold function and related effects on cAMP signaling as the main cause of the effects observed. LPS stimulation caused a



**Fig. 4** a Enhanced LPS-induced synthesis of MMP-9 in primary microglial cells derived from PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice. Cells were seeded in 6-well plates, starved overnight and used unstimulated (us) or stimulated with LPS (100 ng/ml). The MMP-9 protein content of lysed microglial cells derived from wild-type (wt, *black columns*), knockout (KO, *open columns*) and PI3K $\gamma$ -kinase-dead-knockin (KD, *hatched columns*) mice were analyzed with a MMP-9-specific antibody. Western blot analyses were performed before and after 24-h LPS stimulation. Values are mean + SEM,  $n = 3-8$ . #  $p < 0.05$ , #significant difference between the unstimulated (us) and LPS-stimulated state (two-way ANOVA, treatment effect), \*significant difference between wt and KO (one-way ANOVA followed by Holm-Sidak test for post hoc multiple comparisons). b Extracellular MMP-9 activity of primary microglial cells derived from wild-type (wt, *black columns*), knockout (KO, *open columns*) and PI3K $\gamma$ -kinase-dead-knockin (KD, *hatched columns*) mice was analyzed by zymography of cell culture supernatants. Cells were seeded in 6-well plates, starved overnight and used as well (us) or stimulated with LPS (100 ng/ml) for 24 h. 500  $\mu$ l of cell culture supernatant was concentrated (30 kDa size exclusion) and used for gelatin zymography. Values are mean + SEM,  $n = 17$ . \*  $p < 0.05$ , #significant difference between the unstimulated (us) and LPS-stimulated state (two-way ANOVA, followed by Holm-Sidak test for post hoc multiple comparisons), \*significant difference between wt and KO, \$significant difference between KO and KD (one-way ANOVA followed by Holm-Sidak test for post hoc multiple comparisons)

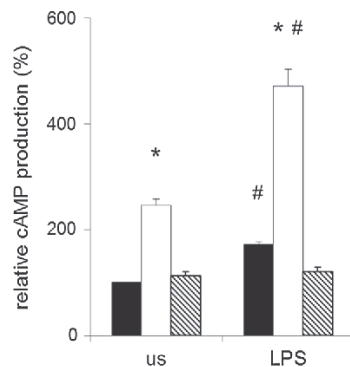
#### PI3K $\gamma$ Controls MMP-9 by Suppression of Intracellular cAMP Level

Our recent reports identified control of cAMP signaling as a prominent lipid kinase-independent activity of PI3K $\gamma$  in the heart (Patrucco et al. 2004; Perino et al. 2011). In cardiomyocytes, PI3K $\gamma$  stimulates cAMP phosphodiesterase activity via direct interaction with PDE3B and PDE4, leading to increased cAMP level and increase of heart contraction in PI3K $\gamma$ -deficient mice (Kerfant et al. 2007; Perino et al. 2011). On the basis of these data, we asked for similar signaling reactions of PI3K $\gamma$  in microglia. As shown in Fig. 5, PI3K $\gamma$ -deficient microglia exhibited strongly increased cAMP in comparison with wild-type microglia or cells expressing PI3K $\gamma$ <sup>KD/KD</sup>. This effect could be shown before and after LPS treatment. We consequently looked for the role of PI3K $\gamma$ -dependent cAMP signaling on MMP-9 expression. To assess the role of cAMP-signaling mediators in the control of MMP-9 expression, a pharmacological approach was used. Treatment of primary microglial cells with H89, an inhibitor of cAMP-dependent protein kinase A (PKA), potently inhibited induction of MMP-9 production by LPS in cells of all genotypes (Fig. 6). On the contrary, stimulation with forskolin (an activator of adenylate cyclases) promoted MMP-9 secretion. Differences between genotypes were no longer seen in the latter setting, presumably because the MMP-9 induction becomes saturated. The same was observed for treatment of the cells with cilostamide or IBMX, both inhibitors of cAMP phosphodiesterases, which led to

marked enhancement of MMP-9 secretion in the three mouse strains under consideration, which was more pronounced in supernatants derived from microglial cells of PI3K $\gamma$ -deficient mice.

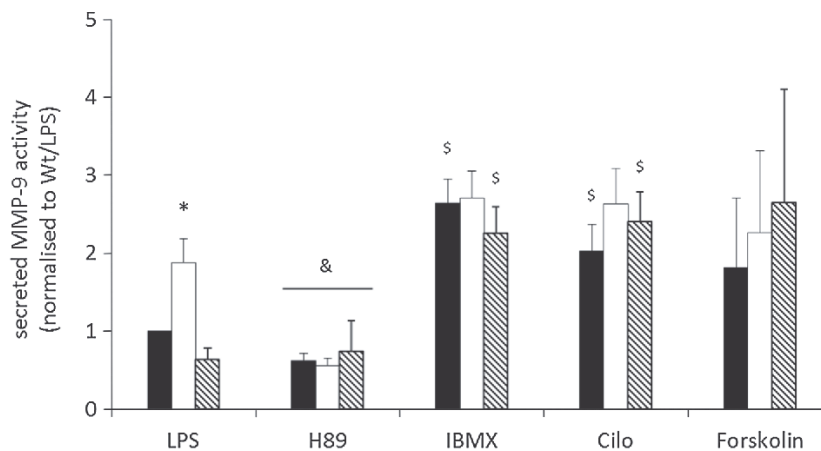
Together, these data disclose PI3K $\gamma$  as a negative mediator of the LPS-induced effects on MMP-9 regulation in primary microglia.





**Fig. 5** Increased cAMP levels in primary microglial cells derived from knockout ( $PI3K\gamma^{-/-}$ , open columns) mice compared to those from wild-type (black columns) and  $PI3K\gamma$ -kinase-dead-knockin ( $PI3K\gamma^{KD/KD}$ , hatched columns) mice. Cells were seeded in 6-well plates, starved overnight and stimulated with LPS for 2 h. cAMP levels were evaluated using Promega cAMP GloAssayKit. Values are mean  $\pm$  SEM,  $n = 4$ . \* $p < 0.05$ , #significant difference between unstimulated (us) and LPS-stimulated microglial cells derived from the respective mouse strain (two-way ANOVA, treatment effect), \*significant difference between wt and KO within the respective treatment group (one-way ANOVA followed by Holm–Sidak test for post hoc multiple comparisons)

pronounced stimulation of MMP-9 activity. Together, these data further support the control of  $PI3K\gamma$ -dependent expression of MMP-9 via regulation of cAMP levels.



**Fig. 6** cAMP signaling regulates LPS-stimulated MMP-9 secretion in primary microglial cells. Extracellular MMP-9 activity was analyzed by gel zymography of cell culture supernatants from primary microglial cells derived from wild-type (black columns), knockout ( $PI3K\gamma^{-/-}$ , open columns) and  $PI3K\gamma$ -kinase-dead-knockin ( $PI3K\gamma^{KD/KD}$ , hatched columns) mice. Microglia were seeded in 12-well plates, starved overnight and activated by LPS (100 ng/ml; 24 h). Thereafter cells were treated with H89 (10  $\mu$ M, PKA inhibitor), IBMX (500  $\mu$ M, competitive non-selective phosphodiesterase inhibitor), cilostamide (Cilo, 10  $\mu$ M, PDE3B inhibitor), or forskolin (Forsk, 10  $\mu$ M, activator of adenylate cyclase), and compared to LPS stimulation. The cell culture supernatants were concentrated (30 kDa size exclusion) and used for zymography.

## Discussion

Our comparative investigation of plasma protein extravasation after LPS-induced systemic inflammation exhibited a time-dependent progression of BBB disturbance in  $PI3K\gamma$ -deficient mice. In contrast, wild-type mice or mice harboring a lipid kinase-dead version of  $PI3K\gamma$  revealed regressive tendency. The time course of plasma protein extravasation suggests that the genotype-related differences in BBB breakdown may be related to brain intraparenchymal processes occurring in response to systemic inflammation and concomitant brain tissue MMP upregulation. Immunohistochemical verification clearly shows the MMP-9 expression by perivascular Iba-1-positive microglial cells, which may play a crucial role for maintained BBB deterioration. Previous studies pointed out that activated microglia express MMP-3 together with other inducible MMPs including MMP-9 (Kacimi et al. 2011; Nuttall et al. 2007). However, an increase in MMP-14 expression after LPS stimulation was not observed, which corresponds with a recent report showing that upregulation of MMP-14 occurred in late stages of neuroinflammatory and neurodegenerative diseases but not in the acute period after stroke or brain trauma (Langenfurth et al. 2014).

Microglial cells are prone to trigger neuroinflammatory activation during systemic inflammation because of their

MMP-9 secretion induced by LPS is abrogated by protein kinase A inhibition (by H89, 10  $\mu$ M). Activation of adenyl cyclase with forskolin (10  $\mu$ M), or PDE inhibition (by IBMX, 500  $\mu$ M, a competitive non-selective phosphodiesterase inhibitor or cilostamide, Cilo, 10  $\mu$ M, specific PDE3B inhibitor) strongly enhance the LPS-induced MMP-9 release in primary microglial cells. Values are mean  $\pm$  SEM,  $n = 6-7$ . \* $p < 0.05$ , \*significant difference between  $PI3K\gamma^{-/-}$  and wild type as well as  $PI3K\gamma^{KD/KD}$ , \$significant differences compared to LPS stimulation, &significant differences compared to forskolin stimulation. (two-way ANOVA, treatment effect, followed by Holm–Sidak test for post hoc multiple comparisons)

sensitivity to blood borne PAMPs and proinflammatory cytokines (Lehnardt 2010). Stimulation of a wide variety of receptors including toll-like receptors induces a complex, multistage activation process of microglia immediately after pathogen entry into the brain tissue. TLR-mediated inflammatory reactions of microglia typically include LPS-driven upregulation of MMP (Candelario-Jalil et al. 2009; Rosenberg et al. 2001). According to our data, upregulation of MMP goes along with LPS-induced expression of PI3K $\gamma$  (Fig. 2 Suppl.). Thus, PI3K $\gamma$ -dependent control of MMP expression may be conceivable. Mechanistically, candidate signaling reactions initiating PI3K $\gamma$  effects on MMP expression are the AKT and the cAMP-signaling pathways.

Recent data from murine macrophage and microglia cell lines (RAW 264.7 and BV2) have shown that upregulation of LPS-mediated MMP-9 gene expression exhibits AKT—as well as cAMP—dependence (Lee et al. 2012). Our results suggest AKT-independent effects on LPS induced MMP-9 and MMP-13 upregulation in primary murine microglial cells. This can be concluded from similar LPS effects on MMP expression in microglial cells derived from wild-type mice and those containing PI3K $\gamma$  with lipid kinase inactive mutation. Wild-type and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  microglia differ regarding their ability to generate the PI3K lipid kinase product PtdIns 3,4,5P<sub>3</sub> and subsequent stimulation of AKT, but they share similar stimulatory effects on cAMP-dependent phosphodiesterases (Patrucco et al. 2004; Perino et al. 2011). Abolishment of the PDE-dependent inhibitory effects of PI3K $\gamma$  on cAMP signaling in PI3K $\gamma$ -deficient mice may provoke increasing cAMP level, concomitant MMP production and subsequent impairment of BBB as observed in the present study. A cAMP-dependent upregulation of MMP expression and activity by PI3K $\gamma$  deficiency was also verified in cardiomyocytes in response to biomechanical stress (Guo et al. 2010).

Our results are in accordance with our previous data revealing that loss of PI3K $\gamma$  results in block of microglial phagocytosis via cAMP-dependent activation of protein kinase A (Schmidt et al. 2013). Herein, we showed for the first time a control of immune-cell function by regulatory effects of PI3K $\gamma$  on cAMP signaling. Hence, PI3K $\gamma$  may affect specific functions of the immune system either by lipid kinase activity or by lipid kinase-independent effects on cAMP signaling.

## Conclusion

Our data disclose the signaling protein PI3K $\gamma$  as a key mediator of LPS-induced microglial MMP-9 production and subsequent BBB deterioration in the course of SIRS-associated SAE. In contrast to recent reports on regulatory

functions of PI3K $\gamma$  in microglia-mediated inflammatory responses after brain ischemia or neurodegeneration (Jin et al. 2010; Passos et al. 2010), our data suggest a lipid kinase-independent stimulation of PDE activity by PI3K $\gamma$  as a crucial mediator, which controls LPS-induced MMP expression and activation. These results confirm and expand recent data on regulatory effects of PI3K $\gamma$  on cAMP signaling in the immune system.

**Acknowledgments** The authors acknowledge Mrs. R.-M., Zimmer for skillful technical assistance, and F. D. Bohmer, for his collegial review of the manuscript. The study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, Priority Program 1160 and Grant RTG 1715) and by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF; Grant FKZ 01EO1002; Center for Sepsis Control and Care). A.F. is a Ph.D. student of the Jena School for Microbial Communication, Priority Program 1160 of the DFG and supported in part by the Integrated Research and Treatment Center, Center for Sepsis Control and Care, Jena University Hospital, Jena, Germany. C.S. and N.S. are PhD students of the Research Training Group 1715 “Adaptive Stress Responses” Grant RTG 1715 of the DFG.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Banks, W. A., & Erickson, M. A. (2010). The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. *Neurobiology of Diseases*, 37(1), 26–32. doi:10.1016/j.nbd.2009.07.031.
- Candelario-Jalil, E., Yang, Y., & Rosenberg, G. A. (2009). Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience*, 158(3), 983–994. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.06.025.
- Comim, C. M., Vilela, M. C., Constantino, L. S., Petronilho, F., Vuolo, F., Lacerda-Queiroz, N., et al. (2011). Traffic of leukocytes and cytokine up-regulation in the central nervous system in sepsis. *Intensive Care Medicine*, 37(4), 711–718. doi:10.1007/s00134-011-2151-2.
- del Zoppo, G. J., Frankowski, H., Gu, Y. H., Osada, T., Kanazawa, M., Milner, R., et al. (2012). Microglial cell activation is a source of metalloproteinase generation during hemorrhagic transformation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32(5), 919–932. doi:10.1038/jcbfm.2012.11.
- Eidelman, L. A., Putterman, D., Putterman, C., & Sprung, C. L. (1996). The spectrum of septic encephalopathy. Definitions, etiologies, and mortalities. *JAMA*, 275(6), 470–473.
- Gonnert, F. A., Recknagel, P., Seidel, M., Jbeily, N., Dahlke, K., Bockmeyer, C. L., et al. (2011). Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. *Journal of Surgical Research*, 170(1), e123–e134. doi:10.1016/j.jss.2011.05.019.
- Guo, D., Kassiri, Z., Basu, R., Chow, F. L., Kandam, V., Damilano, F., et al. (2010). Loss of PI3K $\gamma$  enhances cAMP-dependent MMP remodeling of the myocardial N-cadherin adhesion complexes and extracellular matrix in response to early biomechanical stress. *Circulation Research*, 107(10), 1275–1289. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.229054.
- Gurney, K. J., Estrada, E. Y., & Rosenberg, G. A. (2006). Blood-brain barrier disruption by stromelysin-1 facilitates neutrophil

- infiltration in neuroinflammation. *Neurobiology of Diseases*, 23(1), 87–96. doi:10.1016/j.nbd.2006.02.006.
- Hirsch, E., Katanaev, V. L., Garlanda, C., Azzolino, O., Pirola, L., Silengo, L., et al. (2000). Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science*, 287(5455), 1049–1053.
- Jacob, A., Brorson, J. R., & Alexander, J. J. (2011). Septic encephalopathy: Inflammation in man and mouse. *Neurochemistry International*, 58(4), 472–476. doi:10.1016/j.neuint.2011.01.004.
- Jin, R., Yu, S., Song, Z., Quillin, J. W., Deasis, D. P., Penninger, J. M., et al. (2010). Phosphoinositide 3-kinase-gamma expression is upregulated in brain microglia and contributes to ischemia-induced microglial activation in acute experimental stroke. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399(3), 458–464. doi:10.1016/j.bbrc.2010.07.116.
- Kacimi, R., Giffard, R. G., & Yenari, M. A. (2011). Endotoxin-activated microglia injure brain derived endothelial cells via NF-kappaB, JAK-STAT and JNK stress kinase pathways. *Journal of Inflammation (London)*, 8, 7. doi:10.1186/1476-9255-8-7.
- Kerfant, B. G., Zhao, D., Lorenzen-Schmidt, I., Wilson, L. S., Cai, S., Chen, S. R., et al. (2007). PI3Kgamma is required for PDE4, not PDE3, activity in subcellular microdomains containing the sarcoplasmic reticular calcium ATPase in cardiomyocytes. *Circulation Research*, 101(4), 400–408. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.156422.
- Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological Reviews*, 91(2), 461–553. doi:10.1152/physrev.00011.2010.
- Langenfurth, A., Rinnenthal, J. L., Vinnakota, K., Prinz, V., Carlo, A. S., Stadelmann, C., et al. (2014). Membrane-type 1 metalloproteinase is upregulated in microglia/brain macrophages in neurodegenerative and neuroinflammatory diseases. *Journal of Neuroscience Research*, 92(3), 275–286. doi:10.1002/jnr.23288.
- Lee, D. K., Park, E. J., Kim, E. K., Jin, J., Kim, J. S., Shin, I. J., et al. (2012). Atorvastatin and simvastatin, but not pravastatin, up-regulate LPS-induced MMP-9 expression in macrophages by regulating phosphorylation of ERK and CREB. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 30(3), 499–511. doi:10.1159/000341433.
- Lehnardt, S. (2010). Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: The role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia*, 58(3), 253–263. doi:10.1002/glia.20928.
- Murga, C., Laguinde, L., Wetzker, R., Cuadrado, A., & Gutkind, J. S. (1998). Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors. A role for alpha and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinasegamma. *Journal of Biological Chemistry*, 273(30), 19080–19085.
- Nag, S., Kapadia, A., & Stewart, D. J. (2011). Review: molecular pathogenesis of blood-brain barrier breakdown in acute brain injury. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 37(1), 3–23. doi:10.1111/j.1365-2990.2010.01138.x.
- Nagyoszi, P., Wilhelm, I., Farkas, A. E., Fazakas, C., Dung, N. T., Hasko, J., et al. (2010). Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. *Neurochemistry International*, 57(5), 556–564. doi:10.1016/j.neuint.2010.07.002.
- Nuttall, R. K., Silva, C., Hader, W., Bar-Or, A., Patel, K. D., Edwards, D. R., et al. (2007). Metalloproteinases are enriched in microglia compared with leukocytes and they regulate cytokine levels in activated microglia. *Glia*, 55(5), 516–526. doi:10.1002/glia.20478.
- Passos, G. F., Figueiredo, C. P., Prediger, R. D., Silva, K. A., Siqueira, J. M., Duarte, F. S., et al. (2010). Involvement of phosphoinositide 3-kinase gamma in the neuro-inflammatory response and cognitive impairments induced by beta-amyloid 1–40 peptide in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(3), 493–501. doi:10.1016/j.bbi.2009.12.003.
- Patrucco, E., Notte, A., Barberis, L., Selvetella, G., Maffei, A., Brancaccio, M., et al. (2004). PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell*, 118(3), 375–387. doi:10.1016/j.cell.2004.07.017.
- Perino, A., Ghigo, A., Ferrero, E., Morello, F., Santulli, G., Baillie, G. S., et al. (2011). Integrating cardiac PIP3 and cAMP signaling through a PKA anchoring function of p110gamma. *Molecular Cell*, 42(1), 84–95. doi:10.1016/j.molcel.2011.01.030.
- Rosenberg, G. A., Cunningham, L. A., Wallace, J., Alexander, S., Estrada, E. Y., Grossetete, M., et al. (2001). Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat brain: Activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures. *Brain Research*, 893(1–2), 104–112.
- Schmidt, C., Schneble, N., Muller, J. P., Bauer, R., Perino, A., Marone, R., et al. (2013). Phosphoinositide 3-kinase gamma mediates microglial phagocytosis via lipid kinase-independent control of cAMP. *Neuroscience*, 233, 44–53. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.12.036.
- Setz, C., Brand, Y., Radojevic, V., Hanusek, C., Mullen, P. J., Levano, S., et al. (2011). Expression and activity after aminoglycoside exposition. *Neuroscience*, 181(28–39), 2011. doi:10.1016/j.neuroscience.02.043.
- Stephens, L. R., Eguinoa, A., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Cooke, F., Coadwell, J., et al. (1997). The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell*, 89(1), 105–114.
- Stoyanov, B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., et al. (1995). Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science*, 269(5224), 690–693.
- Wilson, J. X., & Young, G. B. (2003). Progress in clinical neurosciences: Sepsis-associated encephalopathy: evolving concepts. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 30(2), 98–105.
- Woo, M. S., Park, J. S., Choi, I. Y., Kim, W. K., & Kim, H. S. (2008). Inhibition of MMP-3 or -9 suppresses lipopolysaccharide-induced expression of proinflammatory cytokines and iNOS in microglia. *Journal of Neurochemistry*, 106(2), 770–780. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05430.x.
- Yang, Y., & Rosenberg, G. A. (2011). Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke*, 42(11), 3323–3328. doi:10.1161/STROKEAHA.110.608257.

### 3.4 Manuskript IV

#### 3.4.1 Zusammenfassung

##### **The fifth dimension of innate immunity**

C. Schmidt, N. Schneble, R. Wetzker

*Journal of Cell Communication and Signaling* Dec;8(4):363-7.

Das angeborene Immunsystem dient als Abwehrmechanismus und körpereigene Barriere zum Schutz vor Pathogenen. Zelluläre und humorale Elemente detektieren infektiöse Parasiten, initiieren inflammatorische Resistenzreaktionen und induzieren die Elimination invasiver Bestandteile. Wiederholte Infektionen mit Pathogenen haben zur Folge, dass adaptive Reaktionen des angeborenen Immunsystems induziert werden, welche zu Toleranzreaktionen des Organismus führen. Stimulatorische Effekte auf eine bereits vorliegende Primärinfektion und die nachgeschaltete Immunantwort, konnten beobachtet werden. Zusätzlich zu zeitlichen Abläufen und der Lokalisation angeborener Immunreaktionen, spielt die Dosis eindringender Krankheitserreger während der Folgeinfektion eine wichtige Rolle. Diese dosisabhängigen, hormetischen Reaktionsmuster könnten als „Fünfte Dimension des angeborenen Immunsystems“ betrachtet werden.

Verschiedene Studien zeigten eine hormetische Reaktion der Zellen des angeborenen Immunsystems in Abhängigkeit von der Menge pathogener Krankheitserreger (Foster et al., 2007). Adaptive Reaktionen können anhand verschiedener *in vitro* Modelle an Mikrogliazellen und Makrophagen aufgezeigt werden. Lipopolysaccharid, als Endotoxin, imitiert eine inflammatorische Reaktion durch Pathogene und kann eine Toleranzreaktion des Organismus induzieren. Unsere Beobachtungen zeigten eine ansteigende Phagozytoseaktivität in Mikrogliazellen in hormetischen, niedrigen LPS-Konzentrationen. Hohe Konzentrationen des Endotoxins verminderten die Phagozytose deutlich. Desweiteren zeigen unsere Daten einen Vitalitätssteigernden Effekt hormetischer LPS-Dosen auf Wildtyp Mikrogliazellen. Resultierend daraus, konnte auch die Induktion der Proliferationsfähigkeit dokumentiert werden.

## 3.4.2 Manuskript IV

J. Cell Commun. Signal.  
DOI 10.1007/s12079-014-0246-6

## RESEARCH ARTICLE

## The fifth dimension of innate immunity

C. Schmidt · N. Schneble · R. Wetzker

Received: 1 July 2014 / Accepted: 25 September 2014  
© The International CCN Society 2014

**Abstract** Innate immunity has evolved as a first line defense against invading pathogens. Cellular and humoral elements of the innate immune system detect infectious parasites, initiate inflammatory resistance reactions and finally contribute to the elimination of the invaders. Repeated attacks by pathogenic agents induce adaptive responses of the innate immune system. Typically, reapplication of pathogens provokes tolerance of the affected organism. However, also stimulatory effects of primary infections on subsequent innate immune responses have been observed. The present overview touches an undervalued aspect in the innate immune response: Its pronounced dependency on pathogen load. In addition to localization and timing of innate immune responses the pathogen dose dependency might be considered as a “fifth dimension of innate immunity”. Experimental results and literature data are presented proposing a hormetic reaction pattern of innate immune cells depending on the dose of pathogens.

**Keywords** Innate immunity · Adaptive response · Hormesis

## Introduction

Inflammatory responses of the innate immune system include resistance against microorganisms, clearance of damaged cells and regeneration of the affected tissue. These defense reactions are initiated by the interaction of pathogen associated molecular patterns (PAMPs) with pattern recognition receptors (PRR) (Mogensen 2009). Located on the surface and in the cytoplasm of innate immune cells PRR act as sensors for the pathogen attack. Once stimulated they induce resistance

processes aimed at eliminating the pathogen. The pleiotropic functions of the innate immune system are driven by the complex interplay of cellular and humoral components.

As a classical model for the investigation of innate immune reactions macrophages and macrophage like cell lines have been established. These cells sense lipopolysaccharides (LPS) as an archetypal PAMP via specific TLR4 receptors. Subsequent signaling reactions induce reprogramming of the expression pattern and inflammatory stimulation of these cells (Mogensen 2009). Many experimental data have revealed different activation states related to diverging functions of the innate immune system. Macrophages are involved in the phagocytosis and elimination of bacteria as well as in the production of pro- and antiinflammatory mediators, the presentation of antigens to the cells of the adaptive immune system and in the control of regeneration processes at the end of the infectious disease (Biswas and Lopez-Collazo 2009).

Immediate reactions of innate immune cells contributing to bacterial resistance have been extensively investigated during the past decades. Less is known about the mechanistic background of slow acting adaptive responses of the innate immune cells. These adaptive immune reactions allow adjustment to the specific pathological challenge and may prevent overreaction to danger signals. Adaptive responses of innate immunity should not be confused with the classical immune reactions of B-cells, T-cells and other elements of the “adaptive immune system”.

## Adaptive responses

Repeated or prolonged treatment of any organism with an external stress challenge alternatively provokes either reduced reactivity or sensitization of the affected organs. Both reaction

C. Schmidt · N. Schneble · R. Wetzker (✉)  
Institute of Molecular Cell Biology, Center for Molecular  
Biomedicine, Jena University Hospital, 07745 Jena, Germany  
e-mail: Reinhard.Wetzker@uni-jena.de



patterns have been observed in the innate immune system and will be addressed in the next paragraphs of this report.

#### LPS induced tolerance

Reduced reactivity, i.e. tolerance development is of central importance because it keeps the immune reactions in balance and prevents hyperinflammatory responses like septic shock. Experimentally, hyperinflammation can be prevented by “preconditioning” i.e. pretreatment of cells or animals with PAMPs like LPS.

Due to the simple experimental accessibility investigation of LPS induced preconditioning is of special relevance for the mechanistic exploration of tolerance phenomena. As a predominant effect pretreatment of macrophages with LPS provokes suppression of proinflammatory cytokines like TNF $\alpha$  and IL1 $\beta$  and significant stimulation of some anti-inflammatory cytokines including IL10. In addition, an increase in phagocytic activities has been observed (Medzhitov and Hornig 2009; West and Heagy 2002).

In a recent study gene chip analysis was used to explore the alterations of macrophage expression pattern after preconditioning with low doses of LPS (Foster et al. 2007). The data reveal that LPS-induced genes fall in two categories on the basis of their pro- and anti-inflammatory functions. Both classes require specific LPS induced chromatin modifications. These chromatin modifications induce on one hand a transient silencing of genes coding proinflammatory mediators whereas on the other hand a second kind of chromatin modifications is associated with the priming of genes, which include antimicrobial effectors. Thus LPS seems to induce a reprogramming of the expression pattern, aimed at reducing the proinflammatory reactions (Medzhitov and Hornig 2009). At the same time the expression of some anti-inflammatory mediators but also bactericidal functions are boosted. Together these findings indicate exceptional plasticity of LPS/TLR4 induced signaling pathways in macrophages.

#### Tolerance to infections

To survive infections organisms developed two basic strategies: *Resistance*, which suppresses pathogen spreading and *Tolerance*, which allows limiting the host expenses for immune reactions. Due to the limited mechanistic understanding, tolerance phenomena recently attracted much interest of investigators in the field. Like LPS-induced tolerance, tolerance of organisms to infections is accompanied by decreased sensitivity of the affected cells to the arriving pathogenic agent. Concomitant suppression of the innate immune cell reactions allows reduction of the impact of the given pathogen (Medzhitov et al. 2012).

As a measure for tolerance to infections the host vitality or fitness in relation to the pathogen burden has been defined

(Ayres and Schneider 2012). Excessive decrease of host fitness induced by marginally increased pathogen load signifies low tolerance whereas high vitality in face of high pathogen burden indicates high tolerance to infections.

The current knowledge about tolerance inducing agents is still fragmentary. Recent studies indicate promotion or depression of persistent innate immune responses by toxins or auxiliary infections. Figueiredo et al. recently reported a significant *raise of tolerance* development in sepsis mouse model induced by cytotoxic anthracyclines (Figueiredo et al. 2013). The tolerance and vitality promoting effect of anthracyclines is strictly dependent on the activation of DNA damage response and autophagy reactions in the lung of the animals. The authors hypothesize that adaptive induction of both repair systems by cytotoxins acts as modulator of immune responses and might be exploited to confer protection to inflammation-driven conditions, including severe sepsis. *Suppression of tolerance* has been observed after viral-bacterial coinfection of mice. A recent study investigated the effects of Influenza virus on mice infected with *Legionella pneumophila* (Jamieson et al. 2013). In a critical time span the virus promotes susceptibility to lethal bacterial coinfection by impairing the ability of the respiratory tissue to tolerate tissue damage.

#### Trained immunity

In contradiction to tolerance induction primary infections are also able to sensitize the innate immune system. Preexposure of monocytes with bacterial BCG vaccine or fungal cell wall  $\beta$ -glucan induced enhanced production of proinflammatory cytokines after second stimulation (Kleimijenhuis et al. 2012; Quintin et al. 2012). A prolonged functional reprogramming of the cells was observed after pretreatment of the phagocytes with these pathogenic agents. Strikingly, corresponding reactions could be also observed under *in vivo* conditions. Pretreatment of immunodeficient mice missing T-cells and B-cells (SCID) with BCG vaccine or  $\beta$ -glucan induced a significantly enhanced and sustained immune response (Ifrim et al. 2014; Quintin et al. 2014). The authors define the adaptive response of innate immune cells as “Trained immunity” and show strict dependence of the reprogramming of innate immune cells on the specific pathogen applied. Alternative preexposure of adherent monocytes with the PAMPs LPS or  $\beta$ -glucan induces opposite effects on the production of inflammatory cytokines. Whereas LPS is able to repress subsequent cytokine production  $\beta$ -glucan induces a strong enhancement.

Together these data indicate differential effects of pathogenic stressors on adaptive reactions of the innate immune system in the affected organism. The first contact with specific pathogens either leads to a repression and tolerance induction or to enhancement of the subsequent immune response.

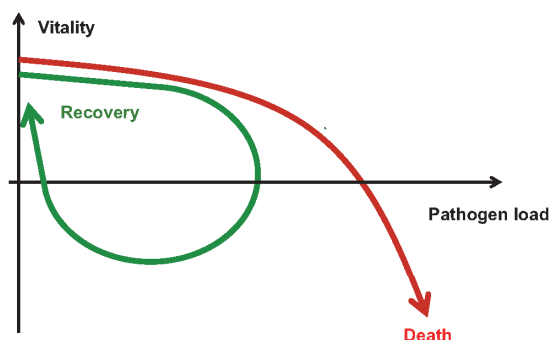
## The fifth dimension of innate immunity

Clearly the innate immune system is able to develop a memory-like plasticity towards specific sequential pathogen attacks. Irrespective of the obvious importance of these immune responses in medicine the mechanistic understanding of these processes is limited. One of the main deficits in the existing data sets seems the limited exploration of dose dependent effects of pathogenic stressors on immune tolerance development.

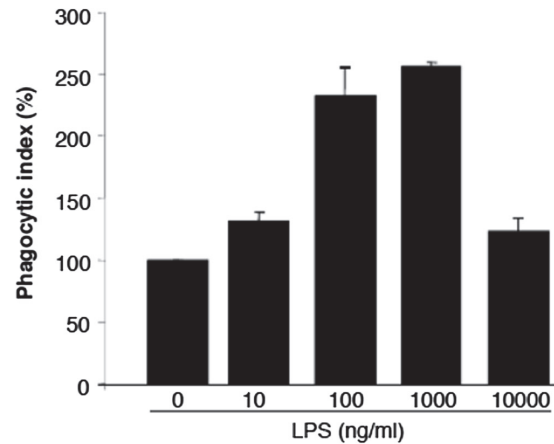
## Dose dependent innate immune responses

Upon monitoring patients during infections, a strict dependency of the vitality on the pathogen dose becomes apparent. If the resistance and tolerance capacities of the hosts innate and adaptive immune defense systems are exhausted the pathogen load exceeds a critical value and the host dies (Fig. 1) (Schneider 2011). On the other hand reduction of the pathogen by resistance activities of the immune system may allow recovery of the infected organism. This simplified view on the interrelation of host vitality and pathogen dose should be mirrored by the reaction pattern of immune cells under *in vitro* conditions. One may predict increasing pathogen resistance of these cells at increasing pathogen challenge and at a critical dose saturation and exhaustion of these defense activities.

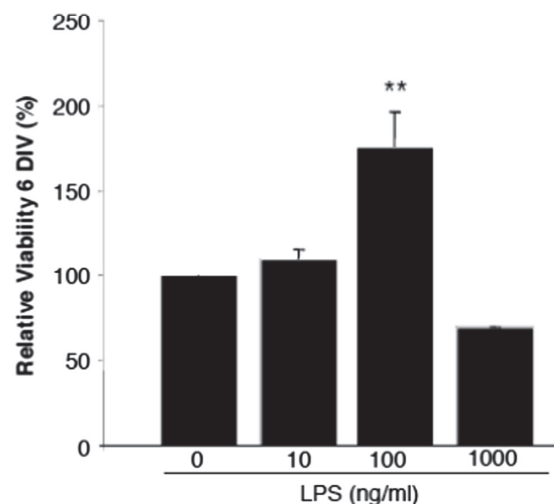
Typical reactions of innate immune cells like phagocytosis of infectious bacteria or cytokine production are promoted by increasing doses of infectious agents and may be saturated or even decline at a critical level of the PAMPs provided by the infectious agents. Surprisingly, only few recent studies investigated effects of the pathogen dose on innate immune cell responses. Of note, dependence of inflammatory reactions on bacterial tissue load has been recently demonstrated in the intestine of mice (Willer et al. 2012). More recent *in vitro* studies revealed differential release of pro- and anti-inflammatory mediators by primary macrophages or macrophage cell lines at increasing doses of LPS (Baker et al. 2014;



**Fig. 1** Vitality versus pathogen-load plot. (adapted from Schneider (2011) PLOS Biology 9 e1001158)



**Fig. 2** LPS-dependent phagocytosis of wild type microglia. Concentration dependent effects of LPS on phagocytotic activity of primary microglia. Primary microglia cells were seeded into 6-well plates and incubated at 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>) for 24 h. After attachment cells were incubated for 24 h in DMEM without FCS in the presence of the indicated LPS concentrations. Phagocytosis assay was performed using GFP producing *Escherichia coli*. Forty microliters of the suspended bacteria was added to the microglial cells and incubated 1 h at 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>). After incubation the cells were harvested, washed and re-suspended in phosphate buffer solution. The phagocytic activity of the cells was measured by flow cytometry using FACS Canto (BD, Heidelberg, Germany)



**Fig. 3** LPS-dependent proliferation of microglial cells. Effects of increasing concentrations of LPS on proliferation of primary microglia. Cells were seeded into 96-well plates and incubated at 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>) for 24 h. After attachment cells were treated with different concentrations of LPS for 6 days under *in vitro* (DIV) conditions. MTT-solution (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) was added to each well and incubated 4 h at 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>). Afterwards the supernatant was aspirated and ethanol (100 % v/v) was added for 30 min. Proliferation was measured by the intensity of blue colored cells at 570 nm in a plate reader. \*\* $P < 0.01$ , compared to unstimulated cells;  $n = 6$

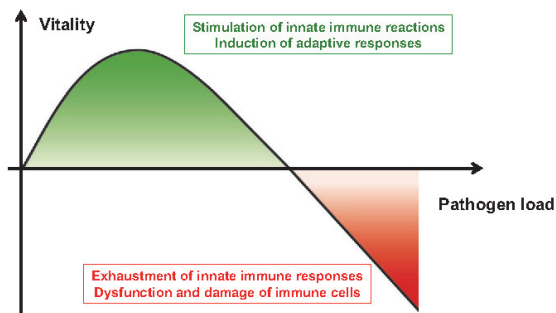


Fig. 4 Hormesis of innate immune-cell responses

Morris et al. 2014). Low concentrations of LPS preferentially induced production of proinflammatory  $\text{TNF}\alpha$  or IL-6, whereas high LPS levels increasingly release anti-inflammatory mediators like IL-10 or IL-33. These investigations clearly indicate dose dependency of the release of pro- and anti-inflammatory cytokines by macrophage like cells.

Our group recently investigated the role of  $\text{PI3K}\gamma$ , an intracellular signaling protein in microglia in the control of phagocytosis of bacteria (Schmidt et al. 2013). In connection to this study we were interested in the dose-dependent effects of LPS on the phagocytic activity. As shown in Fig. 2 an optimal LPS dose has been observed, which induces maximal phagocytic response. Interestingly, the data do not show saturation but a pronounced decline of the phagocytic activities at high LPS. The phagocytosis pattern of macrophage-like microglia may reflect the *in vivo* situation during infections as described above. In fact the dependency of microglia phagocytosis on LPS dose closely mimics a hormetic stress response pattern (Calabrese 2013). Whereas the signaling processes mediating increasing phagocytosis at increasing endotoxin doses are becoming more and more clear (Underhill and Goodridge 2012) the mechanistic background of the drop of phagocytic activity at high LPS is less transparent. Parallel to a saturation of the phagocytic machinery an increasing exhaustion of the energy supply could be predicted. Supplementary investigations of the LPS effects on the expression of the LPS receptor TLR4 revealed saturation pattern including a continuous increased TLR4 expression up to 100 ng/ml LPS followed by nearly constant level until 1,000 ng/ml (data not shown).

Looking at the LPS-dependence of the microglia vitality in the same concentration range there is an even more pronounced decline at high LPS concentrations (Fig. 3). Ongoing experiments of our group are directed at the identification of signaling proteins controlling the stimulatory and inhibitory branch of this hormetic pattern. Preliminary data clearly reveal  $\text{PI3K}\gamma$  in addition to reactive oxygen species (ROS) as essential mediators of the hormetic response (Schmidt C. et al. unpublished data). Our study suggests LPS-induced increase of  $\text{PI3K}\gamma$  expression and the subsequent stimulation of

NADPH oxidases (Lehmann et al. 2009) as a cause of increased ROS. Stimulatory effects of ROS on cell proliferation and vitality have been described in many biological systems (Ostman et al. 2011). The decline of microglia ROS production at high LPS doses still awaits explanation. Together these data hint to a limited capacity of macrophage-like cells to perform efficient immune reactions at high bacterial load and/or endotoxin dose.

The schema in Fig. 4 is aimed at correlating the individual segments of the hormesis plot (Calabrese 2013) to defined responses of innate immune cells induced by pathogens. The illustration underlines the importance of investigations directed to dose-dependent effects of PAMPs like LPS on the immunogenic functions of the innate immune cell.

## Conclusion

In sum the presented data and considerations strongly suggest that strengthening the experimental investigations on innate immune reactions in dependency on the load of the invading pathogen or on the dose of PAMPs is highly warranted. In addition to location and time relations of innate immune responses the dependency on pathogen doses appears as a crucial fifth dimension of innate immunity.

## References

- Ayres, J. S., & Schneider, D. S. (2012). Tolerance of infections. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *Annu Rev Immunol*, 30, 271–294. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075030
- Baker B, Maitra U, Geng S, Li L (2014) Molecular and cellular mechanisms responsible for cellular stress and low-grade inflammation induced by a super-low dose of endotoxin. *J Biol Chem* 289(23): 16262–16269. doi:10.1074/jbc
- Biswas SK, Lopez-Collazo E (2009) Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol* 30(10): 475–487. doi:10.1016/j.it.2009.07.009
- Calabrese EJ (2013) Hormetic mechanisms. *Crit Rev Toxicol* 43(7):580–606. doi:10.3109/10408444.2013.808172
- Figueiredo N, Chora A, Raquel H, Pejanovic N, Pereira P, Hartleben B, Moita LF (2013) Anthracyclines induce DNA damage response-mediated protection against severe sepsis. *Immunity* 39(5):874–884. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.039
- Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R (2007) Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* 447(7147):972–978. doi:10.1038/nri2634
- Ifrim DC, Quintin J, Joosten LA, Jacobs C, Jansen T, Jacobs L, Netea MG (2014) Rained immunity or tolerance: opposing functional programs induced in human monocytes after engagement of various pattern recognition receptors. *Clin Vaccine Immunol* 21(4):534–545. doi: 10.1128/CVI.00688-13
- Jamieson AM, Pasman L, Yu S, Gamradt P, Homer RJ, Decker T, Medzhitov R (2013) Role of tissue protection in lethal respiratory viral-bacterial coinfection. *Science* 340(6137):1230–1234. doi:10.1126/science.1233632



## The fifth dimension of innate immunity

- Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, Joosten LA, Ifrim DC, Saeed S, Netea MG (2012) Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(43): 17537–17542. doi:10.1073/pnas.1202870109
- Lehmann K, Muller JP, Schlott B, Skroblin P, Barz D, Norgauer J, Wetzker R (2009) PI3Kgamma controls oxidative bursts in neutrophils via interactions with PKCalpha and p47phox. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Biochem J* 419(3):603–610. doi:10.1042/BJ20081268
- Medzhitov R, Horg T (2009) Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol* 9(10):692–703. doi:10.1038/nri2634
- Medzhitov R., Schneider, D. S., & Soares, M. P. (2012). Disease tolerance as a defense strategy. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Science*, 335(6071), 936–941. doi: 10.1126/science.1214935
- Mogensen TH (2009) Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* 22(2):240–273. doi: 10.1128/CMR.00046-08
- Morris MC, Gilliam EA, Button J, Li L (2014) Dynamic modulation of innate immune response by varying dosages of lipopolysaccharide (LPS) in human monocytic cells. *J Biol Chem* 289(31):21584–21590. doi:10.1074/jbc.M114.583518
- Ostman A, Frijhoff J, Sandin A, Bohmer FD (2011) Regulation of protein tyrosine phosphatases by reversible oxidation. *J Biochem* 150(4): 345–356. doi:10.1093/jb/mvr104
- Quintin J, Saeed S, Martens JH, Giamarellos-Bourboulis EJ, Ifrim DC, Logie C, Netea MG (2012) Candida albicans infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell Host Microbe* 12(2):223–232. doi:10.1016/j.chom.2012.06.006
- Quintin J, Cheng SC, van der Meer JW, Netea MG (2014) Innate immune memory: towards a better understanding of host defense mechanisms. *Curr Opin Immunol* 29C:1–7. doi:10.1016/j.coi.2014.02.006
- Schmidt C, Schneble N, Muller JP, Bauer R, Perino A, Marone R, Wetzker R (2013) Phosphoinositide 3-kinase gamma mediates microglial phagocytosis via lipid kinase-independent control of cAMP. *Neuroscience* 233:44–53. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.12.036
- Schneider DS (2011) Tracing personalized health curves during infections. *PLoS Biol* 9(9):e1001158. doi:10.1371/journal.pbio
- Underhill DM, Goodridge H (2012) Information processing during phagocytosis. [Review]. *Nat Rev Immunol* 12(7):492–502. doi:10.1038/nri3244
- West MA, Heagy W (2002) Endotoxin tolerance: a review. *Crit Care Med* 30(1 Supp):S64–S73
- Willer Y, Müller B, Bunann D (2012) Intestinal inflammation responds to microbial tissue load independent of pathogen/non-pathogen discrimination. *PLoS ONE* 7(5):e35992. doi:10.1371/journal.pone.0035992

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Die Rolle der PI3K $\gamma$ als Schlüsselprotein inflammatorischer Reaktionen in Mikrogliazellen

PI3K als Regulatoren zellulärer Funktionen nehmen eine zentrale Rolle während inflammatorischer Prozesse ein. Sie gelten als wichtige Schlüsselproteine zur Steuerung der Phagozytose, Migration, Apoptose und Proliferation. Die Charakterisierung der Klasse I<sub>B</sub> PI3K $\gamma$  im Mausmodell belegen die zentrale Bedeutung des Signalproteins in Zellen des Immunsystems (Hirsch et al., 2000, Wymann et al., 2003).

Die bedeutende Funktion von PI3K $\gamma$  in der Pathogenese inflammatorischer Erkrankungen und die dominante Expression in Zellen des Immun- und Nervensystems bestätigen diese Annahme (König et al., 2010, Spitzenberg et al., 2010, Madishetti et al., 2014).

Die vorliegende Arbeit stellt PI3K $\gamma$  als Mediator inflammatorischer Reaktionen von Mikrogliazellen im ZNS vor. Die Aktivierung von PI3K $\gamma$  in Mikrogliazellen führt zur Induktion von Phagozytose, Migration, ROS-Produktion und Proliferation (Schmidt et al., 2013)(Schmidt et al., 2015b manuscript in process; Schneble et al, 2015).

Zur Charakterisierung PI3K $\gamma$ -gesteuerter Mikrogliafunktionen *in vitro* und *in vivo* wurden PI3K $\gamma$  *knockout* und *knockin* Mausmodelle analysiert. Während PI3K $\gamma$  *knockout* Mäuse das PI3K $\gamma$ -Protein nicht produzieren, exprimiert die PI3K $\gamma$  *knockin* Mutante eine Lipidkinase-inaktive Form des Proteins. Damit sind die PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>-Produktion und der PKB/Akt Signalwege blockiert (Vanhaesebroeck et al., 2004).

In der vorliegenden Dissertation wurden veröffentlichte Ergebnisse zu Lipidkinase-abhängigen und -unabhängigen Funktionen von PI3K $\gamma$  in Mikrogliazellen zusammengefasst. Durch Charakterisierung des Signalproteins in Mausmodellen der septischen Enzephalopathie und des Schlaganfalls, wurde die pathologische Relevanz dieser regulatorischen Funktionen untersucht.

#### 4.1.1 PI3K $\gamma$ - abhängige Regulation der Phagozytose

Die Phagozytosefähigkeit von Mikrogliazellen gilt als wesentlicher Mechanismus inflammatorischer Reaktionen und nimmt eine wichtige Rolle innerhalb der physiologischen und pathophysiologischen Funktionen ein (Kettenmann et al., 2011, Neher et al., 2012). Während die Aktivierung der Phagozytose durch extrazelluläre Agonisten und Rezeptoren gut untersucht ist, ist die Rolle intrazellulärer Mediatoren weitgehend unbekannt.

Unsere Daten beschreiben das Signalprotein PI3K $\gamma$  als wichtigen Mediator der Steuerung der Phagozytose in Mikrogliazellen. Unsere Untersuchungen zeigten, dass PI3K $\gamma$ -defiziente Mikroglia weniger *E.coli* oder *Zymosan*-Partikel absorbierten, also eine deutliche Verminderung der Phagozytoserate aufwiesen (Schmidt et al., 2013). Die pharmakologische Analyse mit Inhibitoren aller PI3K-Isoformen zeigte, dass PI3K $\gamma$  als Kontrollelement der Phagozytose in Mikrogliazellen fungiert.

In Monozyten und Makrophagen wurde die Beteiligung des PI3K-Signalweges zur Steuerung der Phagozytose bereits von Lee et al. und Tamura et al. nachgewiesen (Lee et al., 2007, Tamura et al., 2009).

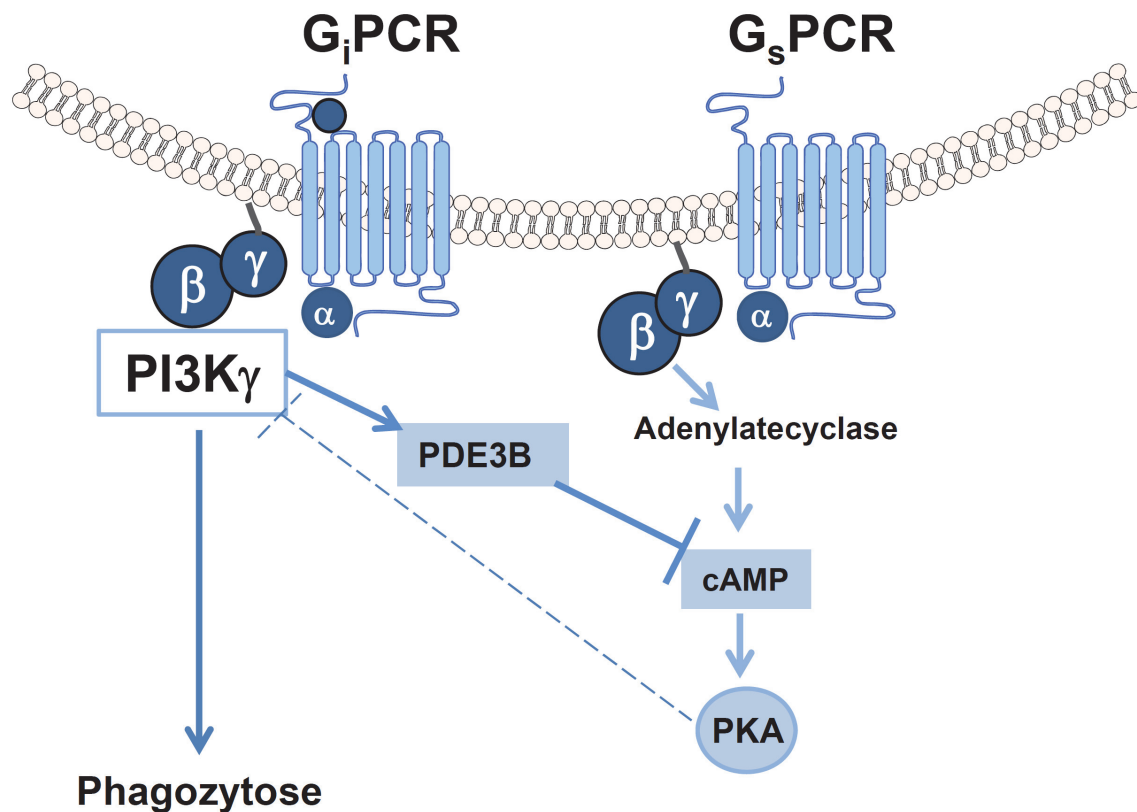
Tamura et al. identifizierten mittels siRNA Analysen PI3K $\alpha$  als Mediator zur Induktion der Phagozytose. Sie zeigten, dass Makrophagen vorwiegend über die PI3K $\alpha$ -Lipidkinase-Aktivität PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> generieren. In Makrophagen und Monozyten führt die Deletion der PI3K $\alpha$  zu reduzierter PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>-Produktion und zur Hemmung der Phagozytosefähigkeit. PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> trägt hier zur Formung der Phagosomenstruktur bei (Araki et al., 1996, Swanson, 2008). Neben der Beteiligung von PI3K $\alpha$ , zeigten Leverrier et al., dass auch PI3K $\beta$  eine übergeordnete Funktion während Fc $\gamma$ -rezeptor-gesteuerter Phagozytose einnimmt. Wohingegen die Deletion von PI3K $\gamma$  und PI3K $\delta$  keinen Einfluss auf die Phagozytoseaktivität in Makrophagen hatte (Leverrier et al., 2003). Die Behandlung mit PI3K-Inhibitoren (LY294002 und *Wortmannin*) hemmte die Formung der Phagosomenstruktur und die Absorption apoptotischer Zellen (Araki et al., 1996).

Kontrovers zu den Ergebnissen von Tamura et al. und Lee et al. weisen unsere Daten darauf hin, dass zur Steuerung der Phagozytose in Mikrogliazellen die PI3K-Lipidkinaseabhängige Bildung von PtdIns (3,4,5)P<sub>3</sub> nicht essentiell ist. Die Modellierung der Phagosomenstruktur scheint also nicht über PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> Akkumulation induziert zu werden (Araki et al., 1996). Es zeigte sich, dass PI3K $\gamma$  einen stimulatorischen Effekt auf die PDE3B-Aktivität ausübt und über Regulation des cAMP-Niveaus die Phagozytose mikroglialer Zellen steuert. Unsere Daten

beschreiben PI3K $\gamma$  als Mediator im cAMP-Signalweg des angeborenen Immunsystems und bestätigen einen inhibitorischen Effekt zu hoher cAMP-Konzentrationen auf die Phagozytose von Mikrogliazellen (Abb. 7).

Die Behandlung mikroglialer Zellen mit PI3K-Inhibitoren AS605240 und *Wortmannin* führte neben der Hemmung der Phagozytose zu einem Anstieg des cAMP-Niveaus. Es deutete sich an, dass die PI3K Lipidkinase-Aktivität indirekt in die Regulation des cAMP-Spiegels involviert ist. Ein ähnlicher stimulatorischer Effekt von PI3K auf die PDE3B-Aktivität wurde bereits in Adipozyten über eine PKB/Akt-abhängige Phosphorylierung von PDE3B beschrieben (Baragli et al., 2011, Degerman et al., 2011). Korrelierend mit diesen Daten scheint die Inhibition von PI3K $\gamma$  in Mikrogliazellen zur Suppression der PDE3B-Aktivität zu führen. Als Konsequenz führt der Anstieg des cAMP-Spiegels zur Hemmung der Phagozytose (Abb. 7).

Als eine der Aufgaben aktivierter Mikrogliazellen dient die Phagozytose zur Elimination von Pathogenen, apoptotischen Neuronen und potenziell inflammatorischen Komponenten (Neumann et al., 2009). Sie nehmen dabei eine protektive Rolle ein und induzieren die Regeneration geschädigten Gewebes (Hanisch and Kettenmann, 2007). Eine insuffiziente Phagozytose führt dagegen zu inadäquaten regenerativen Prozessen. Der Nachweis von PI3K $\gamma$  als Mediator phagozytotischer Reaktionen in Mikrogliazellen könnte in diesem Zusammenhang von medizinischer Relevanz sein. Erkrankungen, die zur Elimination von vitalen Neuronen durch Mikrogliazellen führen, könnten mittels pharmakologischer Inhibition der PI3K $\gamma$  oder PDE3B therapiert werden (Brown and Neher, 2012, Neher et al., 2012).



**Abbildung 7 - PI3K $\gamma$ -Lipidkinase-unabhängige Regulation der Phagozytose in Mikrogliazellen**

Die Bindung eines Liganden an den G<sub>i</sub>-gekoppelten Rezeptoren, welcher in der Membran mikroglialer Zellen verankert ist, führt zur Aktivierung von PI3K $\gamma$ . Die nachgeschaltete Interaktion von PI3K $\gamma$  mit PDE3B und die Aktivierung dieser, induziert die Hydrolyse von intrazellulärem cAMP. Infolgedessen wird die Aktivität der PKA reduziert und phagozytotische Vorgänge, wie in Wildtyp und PI3K $\gamma$  *knockin* Mikroglia gezeigt, können ablaufen.

Mikrogliazellen mit fehlendem PI3K $\gamma$ -Protein zeigen hingegen eine stark verminderte Phagozytoserate. Die Stimulation des G<sub>s</sub>-gekoppelten Rezeptors induziert eine Erhöhung des cAMP-Niveaus, was in reduzierter phagozytotischer Aktivität resultiert. Der *knockout* von PI3K $\gamma$  führt zu deutlich verminderter Aktivität von PDE3B, so dass erhöhte cAMP-Konzentrationen einen inhibitorischen Effekt auf immunologische Mikrogliafunktionen ausüben.

#### 4.1.2 PI3K $\gamma$ als Mediator der ROS-Produktion

Neuroinflammatorische und neurodegenerative Zustände im ZNS führen zur Aktivierung immunologischer Funktionen von Mikrogliazellen, die mit der Sekretion inflammatorischer Zytokine und ROS einhergehen. Verbunden mit dem Aktivierungsprozess wird während der Phagozytose die Bildung von ROS durch NADPH-oxidasen (Nox) im Phagosom induziert (Sun et al., 2008, Brown and Neher, 2010). Die Nox-abhängige ROS-Produktion wurde auch in Neutrophilen und Makrophagen nachgewiesen (Block et al., 2007, Lehmann et al., 2009, Brown and Neher, 2010).

PAMPs (LPA, LPS,) und DAMPs (ATP, UDP) imitieren inflammatorische Reaktionen (Abb. 3), aktivieren phagozytotische Vorgänge und die damit verbundene Generierung von ROS in Mikrogliazellen *in vivo* und *in vitro* (Brown, 2007, Koizumi et al., 2007, Sun et al., 2008).

Eigene, bisher nicht veröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die Generierung von ROS nach LPS/ATP-Stimulation dosisabhängig in Mikrogliazellen induziert wird. Vorbehandlung mit pharmakologischen Inhibitoren der Klasse I PI3K führten nur nach PI3K $\gamma$ -Inhibition, mittels AS605240, zur deutlichen Reduktion der ROS-Produktion. Die Hemmung von PI3K $\alpha,\beta$  und  $\delta$  zeigte keinen blockierenden Effekt. Die durch AS605240 hervorgerufene Verminderung der ROS-Produktion deutete an, dass PI3K $\gamma$  als Mediator dieser Funktion fungiert. Bestätigt wurden unsere Daten durch Verwendung von *shRNA*-transfizierten Mikrogliazelllinien in denen die PI3K-Isoform  $\alpha,\beta,\delta$  oder  $\gamma$  supprimiert waren. PI3K $\alpha,\beta,\delta$  *knockdown* Zellen reagierten auf Stimulation mit LPS oder ATP mit deutlich gesteigerter ROS-Produktion, während PI3K $\gamma$  *knockdown* Zellen keine Anstieg von ROS induzierten. (Schmidt et al., 2015b, manuscript in process). Vergleichende Analysen in primären Mikrogliazellen aus Wildtyp, PI3K $\gamma$  *knockout* und PI3K $\gamma$  *knockin* Mäusen konnten diese Daten bestätigen: PI3K $\gamma$  *knockout* und *knockin* wiesen hierbei ein supprimiertes ROS-Niveau auf. Dieser identische Phänotyp deutete an, dass PI3K $\gamma$  Lipidkinase-abhängig die ROS-Produktion in Mikrogliazellen reguliert.

Die dosisabhängige Erhöhung des ROS-Niveaus, nach LPS- oder ATP-Behandlung im Wildtyp, deutet auf hormetische Reaktionsmuster zur ROS-Generation hin (Schmidt et al., 2014). Im Vergleich zeigten PI3K $\gamma$  *knockout* und *knockin* Mikroglia keine dosisabhängige Induktion von ROS. Bereits 2009 publizierte Daten unserer Arbeitsgruppe identifizierten PI3K $\gamma$  als Mediator der ROS-Produktion

in Immunzellen. Lehmann et al. beschrieben PI3K $\gamma$  als intrazellulären Regulator zur ROS-Bildung und des *oxidative burst* in Neutrophilen. Dieser Prozess wird offenbar über die Proteinkinase-Aktivität des Signalproteins gesteuert (Lehmann et al., 2009). Kontrovers zu vorliegenden Studien zur Lipidkinase-unabhängigen Steuerung der Phagozytose in Mikrogliazellen, scheint die Induktion der ROS-Produktion direkt über die Kinaseaktivität des Signalproteins kontrolliert zu werden (Schmidt et al., 2013).

Durch Modulation des ROS-Niveaus könnten neurodegenerative Prozesse unterbunden werden (Brown and Neher, 2010, Neher et al., 2011). Inhibition von PI3K $\gamma$  mit AS605240 und die Behandlung mit Antioxidanzien könnte als therapeutischer Ansatz genutzt werden.

#### 4.1.3 PI3K $\gamma$ und ROS als Mediatoren der Proliferation

Immunologische Funktionen von Mikrogliazellen werden u. a. über ROS kontrolliert. ROS fungieren hierbei als Botenstoff und steuern Proliferation und Phagozytose über die Modulation verschiedener Signalwege (Mander et al., 2006, Sun et al., 2008). Hohe Konzentrationen ROS, die durch neuroinflammatorische Prozesse freigesetzt werden, wirken als zytotoxische Moleküle zur Abwehr und Elimination von Pathogenen (Block et al., 2007, Brown, 2007). Abhängig vom Aktivierungsstatus nehmen ROS in Mikrogliazellen eine duale Rolle ein (Block et al., 2007). Während im M1-Phänotyp sehr hohe Konzentrationen Superoxid gebildet werden und neurotoxische, degenerative Prozesse ausgelöst werden können, zeigt der M2-Phänotyp, dass niedrige Konzentrationen von ROS als *second messenger* fungieren (Davies, 1999).

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe und anderer zeigten, dass Mikrogliazellen abhängig von ihrer Aktivierung einen deutlichen Anstieg ihrer Proliferationsrate aufwiesen (Kaneko et al., 2009)(Schmidt et al., 2015b, manuscript in process). Kaneko et al. analysierten unterschiedliche LPS-Konzentrationen auf die Proliferations- und Überlebensrate primärer Mikrogliazellen. Korrelierend mit unseren bisher unveröffentlichten Daten zeigten sie, dass LPS-aktivierte Mikroglia eine erhöhte Vitalität *in vitro* aufwiesen (Kaneko et al., 2009, Kaneko et al., 2012). Andere Arbeitsgruppen bestätigten zudem, dass Vitalität und Proliferation verschiedener Zellen und Gewebe durch ROS (spezielle Wasserstoffperoxid) reguliert werden (Abid et al., 2000, Heinloth et al., 2000, Mander et al., 2006). Dabei resultieren niedrige (hormetische) Konzentrationen von LPS/ATP in erhöhter Proliferationsrate (Schmidt et al., 2015b, in process). Im Wildtyp zeigte sich, korrelierend zum ROS-Niveau, ein



Anstieg der Proliferationsrate, während im PI3K $\gamma$  *knockout* und PI3K $\gamma$  *knockin* nur eine basale Proliferation dokumentiert werden konnte (Schmidt et al., 2015b, unpublished). Durch Behandlung der Zellen mit Antioxidanzien (NAC) konnten wir zeigen, dass eine Verminderung von ROS zur Hemmung der Proliferation führt. Stimulationsexperimente mit LPS und ATP nach Vorinkubation mit NAC, zeigten eine deutliche Reduktion der Proliferationsfähigkeit in Wildtyp Mikroglia, während ein Effekt auf PI3K $\gamma$  *knockout* und PI3K $\gamma$  *knockin* Mikroglia nicht nachgewiesen werden konnte (Schmidt et al., 2015b, unpublished). Anhand pharmakologischer Inhibition aller Klasse I PI3K nach LPS/ATP Stimulation, konnten wir bestätigen, dass PI3K $\gamma$  die Proliferation mikroglialer Zellen reguliert. Inflammatorische, neurodegenerative Erkrankungen, wie Alzheimer und Parkinson, können durch oxidativen Stress ausgelöst werden. Die Neutralisation von ROS könnte hierbei als therapeutisches Ziel angesehen werden (Block et al., 2007, Brown and Neher, 2010). Ein neuer Ansatz wäre, mittels PI3K $\gamma$ -Inhibition eine Verminderung des ROS-Niveaus zu erreichen, so dass nur geringe Konzentrationen im ZNS vorliegen (Sun et al., 2008). Diese geringen Konzentrationen ROS fungieren als *second messenger* für protektive Mikrogliafunktionen und aktivieren PI3K $\gamma$ . Eine Hemmung von oxidativem Stress durch PI3K $\gamma$ -Inhibition in Mikrogliazellen könnte zur Reduktion inflammatorischer ZNS-Schädigung genutzt werden.

Vergleichende Daten zu ROS und Proliferation in Wildtyp, PI3K $\gamma$  *knockout* und PI3K $\gamma$  *knockin* Mikroglia wurden bisher nicht veröffentlicht. Das Manuskript befindet sich in Bearbeitung und wird voraussichtlich im Dezember 2015 publiziert.

#### 4.1.4 Hormetische Effekte

Aktivierte Mikroglia werden als wichtigster Zelltyp der angeborenen Immunantwort im ZNS beschrieben (Town et al., 2005). Ihre differentiellen Aktivierungsstadien (M1 und M2) sind eng mit verschiedenen Funktionen innerhalb der Immunsystems verknüpft. Eine wiederholende Aktivierung von Mikroglia durch Pathogene, zellulären Stress, Trauma und Substanzen apoptotischer Neuronen, führt zu Toleranz oder dauerhafter Aktivierung der Immunzellen (Medzhitov et al., 2012).

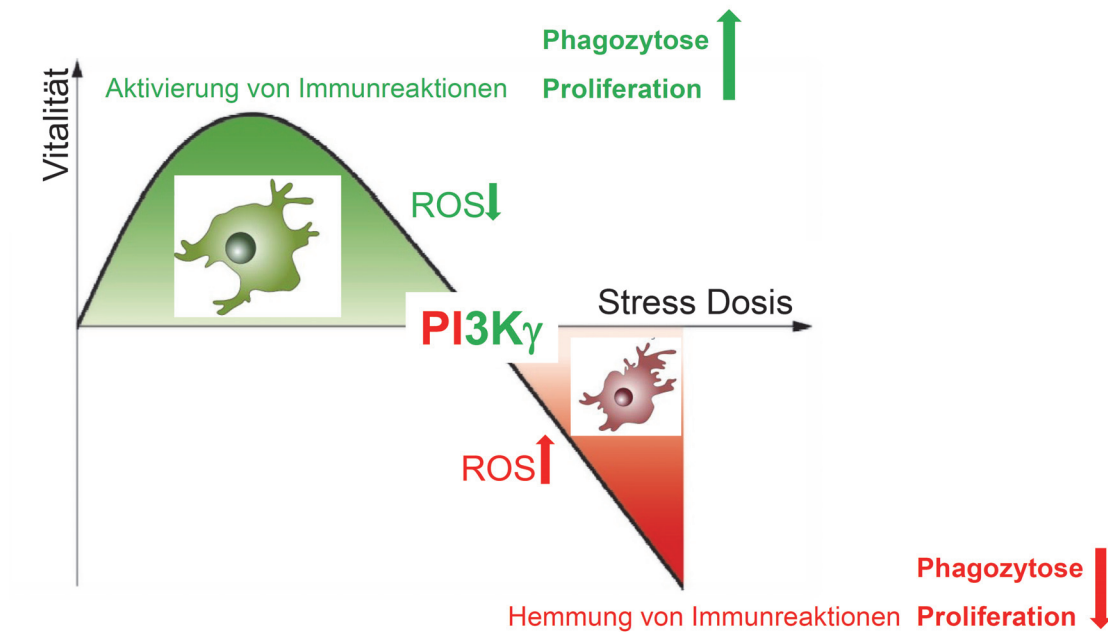
In Zusammenhang mit protektiven und degenerativen Eigenschaften mikroglialer Zellen konnten wir nicht-lineare (hormetische) Effekte steigender LPS-Dosen auf Proliferation, ROS-Produktion und Phagozytose nachweisen (Schmidt et al., 2014). Daten unserer Arbeitsgruppe zeigten auch, dass niedrige Konzentrationen LPS und ATP zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies führen (Schmidt et al.,

2014). ROS übt in diesem Dosisbereich einen positiven Effekt auf Überleben und Vitalität der Mikrogliazellen aus. (Block et al., 2007).

Experimentelle Studien an Makrophagen zeigten bereits, dass Prekonditionierung mit niedrigen LPS-Dosen, die Sekretion von TNF- $\alpha$  und IL1 $\beta$ , als pro-inflammatorische Zytokine, supprimiert. Eine erneute Stimulation der Zellen mit LPS induziert die Freisetzung anti-inflammatorischer Zytokine (Medzhitov et al., 2012). Während neurodegenerativer Erkrankungen könnte die Entstehung einer solchen Toleranzreaktion hyperinflammatorische Reaktionen von Mikrogliazellen unterdrücken und die Ausbreitung neuronaler Defekte verhindern. Kaneko et al. beschrieben in diesem Zusammenhang, dass niedrige Konzentrationen von LPS Apoptose-Vorgänge blockieren und eine Erhöhung der Proliferation *in vitro* induzieren (Kaneko et al., 2009, Kaneko et al., 2012).

In unseren Versuchen zeigte die Behandlung von Wildtyp Mikrogliazellen, mit verschiedenen LPS-Konzentrationen, die höchste Phagozytose-Rate bei 100 ng/ml LPS, wohingegen höhere Dosen keinen stimulatorischen Effekt induzierten (Schmidt et al., 2014). Solche hormetischen Effekte verschiedener Stimulanzen konnten jedoch nur in Wildtyp Mikrogliazellen nachgewiesen werden. PI3K $\gamma$ -defiziente Zellen zeigten nur geringe dosisabhängige Effekte. Die Fähigkeit zu phagozytieren und dabei vitale Neuronen, von bereits Apoptotischen zu unterscheiden steht hierbei in engem Zusammenhang. Abhängig von der Intensität der Schädigung, zeigte sich das Mikrogliafunktionen unterschiedlich reguliert werden. Korrelierend mit unseren Daten zur dosisabhängigen Stimulation von Proliferation und ROS-Produktion durch LPS/ATP, zeigten auch Koizumi et al. ähnliche konzentrationsabhängige Prozesse zur Induktion der Phagozytose nach UDP-Behandlung (Koizumi et al., 2007).

Die Umschaltung zwischen pro- und anti-inflammatorischen Reaktionen kann als hormetische, dosisabhängige Immunantwort beschrieben werden. Innerhalb dieser Prozesse könnte PI3K $\gamma$  eine entscheidende Rolle als "Schalter" zwischen neurotoxischen und neuroprotektiven Funktionen einnehmen (Abb. 8). PI3K $\gamma$ -defiziente Mikroglia weisen eine deutlich reduzierte Reaktionsfähigkeit auf, was auf die klinische Relevanz des Signalproteins während neurodegenerativer Erkrankungen hinweist.



**Abbildung 8 - Schematische Darstellung möglicher hormetischer Effekte von  $PI3K\gamma$**

Dosisabhängige Effekte von PAMPs und DAMPs auf Mikrogliazellen induzieren verschiedene Funktionen. Niedrige Konzentrationen (grün) von ROS in Abhängigkeit von der Stress Dosis führen zu gesteigerter Vitalität, Proliferation und Phagozytose. Sie und charakterisieren den M2-Phänotyp. Wohingegen zu hohe Stress Dosen (rot) den M1-Phänotyp induzieren, welcher mit erhöhter ROS Produktion und reduzierter Vitalität einhergeht. Das Signalprotein  $PI3K\gamma$  könnte als möglicher Schalter zwischen M1- und M2-Mikroglia fungieren

## 4.2 Mikroglia und die Bedeutung der PI3K $\gamma$ in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen

### 4.2.1 Sepsis-induzierte Störungen der Blut-Hirn-Schranke (BBB)

Dysfunktion der BBB nach inflammatorischer Schädigung, führt zu systemischen Defekten innerhalb des ZNS und zur Pathogenese der Septischen Enzephalopathie (SAE) (Michels et al., 2014). Mikrogliazellen gelten neben Endothelzellen als wichtigster Zelltyp zur Regulation der BBB-Eigenschaften während Embryonalentwicklung und Pathogenese neurologischer Defekte (Michels et al., 2014). Nach Aktivierung sind sie befähigt in inflammatorische Regionen zu migrieren und den Verlauf degenerativer Prozesse positiv oder negativ zu beeinflussen. Proteolytische Enzyme, wie Matrix Metalloproteasen (MMP) induzieren dabei Um- und Abbauvorgänge der Extrazellären Matrix (EZM) und ermöglichen Mikrogliazellen sich in geschädigte Gewebe zu bewegen. Verschiedene Studien zeigten, dass die Aktivierung der Mikroglia mittels LPS zur Induktion der MMP-Expression führt. LPS als PAMP, aktiviert TLR4-abhängig Mikrogliazellen, welche wichtige immunologische Reaktionen im Gehirn steuern. Jedoch scheint der Aktivierungsprozess eng mit BBB-Dysfunktion verknüpft zu sein (Sumi et al., 2010, Frister et al., 2014). MMP2 und MMP9 gelten als hauptsächlich durch Mikroglia-sekretierte MMP, welche zur Öffnung der BBB und Induktion inflammatorischer Prozesse führen können (Webster and Crowe, 2006, Könnecke and Bechmann, 2013).

Unsere Studien zeigten, dass die intraperitoneale Injektion von LPS zu deutlich erhöhter Permeabilität der BBB im PI3K $\gamma$  *knockout* Modell führt. Im Gegensatz dazu zeigten sich im Wildtyp und PI3K $\gamma$  *knockin* Modell nur geringe Schädigungen der BBB (Frister et al., 2014). LPS, als bakterielles Endotoxin, induziert die Aktivierung von MMP9 in Mikrogliazellen (Woo et al., 2008). Proteinbiochemische Analysen zeigten in Korrelation zur MMP9-Expression, einen Anstieg der PI3K $\gamma$ -Expression in Mikroglia (Frister et al., 2014). Diese Daten deuten auf eine PI3K $\gamma$  Lipidkinase-abhängige Regulation der MMP9 hin und würden speziell für PI3K $\gamma$  *knockout* die Störung der BBB und erhöhte inflammatorische Reaktionen erklären. Der *knockout* des Proteins führt zur Fehlregulation der MMP9, welche in erhöhter Aktivität und damit verbundener Degradation der BBB resultiert. Im Wildtyp- und *knockin*-Modell hingegen wurde deutlich, dass MMP9 eine basale, nicht-

degradierende Aktivität aufweist. Diese Daten ließen die Annahme zu, dass PI3K $\gamma$  (Lipidkinase-unabhängig) über cAMP die MMP9 Expression negativ reguliert (Frister et al., 2014).

Unsere bisherigen Daten zeigen, dass eine Aktivierung von Mikrogliazellen mit der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, erhöhter Proliferation und Phagozytose einhergeht, welche über PI3K/Akt gesteuert werden (Schmidt et al., 2013) (Schmidt et al., 2015b). Verbunden damit scheint auch die BBB Integrität moduliert zu werden. Vor allem während neurodegenerativer Erkrankungen führen zu hohe ROS-Konzentrationen zur Schädigung der BBB (Schreibelt et al., 2007, Sumi et al., 2010). Neben erhöhter ROS Produktion induzieren inflammatorische Ereignisse im ZNS, ausgelöst durch Pathogene, die Sekretion von MMPs und eine damit verbundene Degradation der BBB (Rosenberg, 2002). Die Regulation der MMP9 erfolgt in Makrophagen und BV2-Zellen Akt- und cAMP-abhängig (Lee et al., 2012). Auch in Cardiomyozyten bestätigte sich, dass die MMP-Sekretion über PI3K $\gamma$  und cAMP gesteuert wird (Guo et al., 2010).

Eine Akt-abhängige Reaktion, wie Lee et al. publizierten, konnte in primären Mikroglia anhand des PI3K $\gamma$  *knockin* Modells nicht gezeigt werden. Messungen zum cAMP Spiegel bestätigten die Annahme, dass PI3K $\gamma$  *knockout* Mikroglia ein deutlich höheres cAMP-Niveau aufwiesen. Korrelierend mit vorliegenden Daten zur Phagozytose, konnte auch im Modell der SAE die Interaktion der PI3K $\gamma$  mit PDE3B gezeigt werden. Durch PI3K $\gamma$ -abhängige Aktivierung der PDE3B, wird die Hydrolyse von cAMP in Wildtyp und PI3K $\gamma$  *knockin* Mikroglia induziert. Die daraus resultierende basale MMP9-Aktivität reduziert die erhöhte BBB Permeabilität und blockiert damit u.a. die Invasion pathogener Mikroorganismen.

Die Inhibition der MMPs könnte im Falle von cerebraler Ischämie, viraler oder bakterieller Infektion zur Therapie beitragen und Störungen der BBB reduzieren (Rosenberg, 2002).

#### 4.2.2 Schlaganfall und Ischämie

Cerebrale Ischämie und Schlaganfall induzieren eine Kaskade zellulärer und molekularer Mechanismen, welche zu inflammatorischen Prozessen und Schädigung von Geweben innerhalb des Gehirns führen. Eine wesentliche Rolle nehmen dabei Mikrogliazellen ein. Ihre schnelle Aktivierung, die Produktion von ROS, proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, als auch die Infiltration von Neutrophilen und T-Zellen in geschädigte Regionen, charakterisieren diese neurodegenerativen Prozesse (Jin et al., 2010, Jin et al., 2011).

Im MCAO-Modell, welches einen Schlaganfall imitiert, untersuchten wir anhand genotypisch-veränderter Mausmodelle den Effekt von PI3K $\gamma$ . *In vitro* Analysen erfolgten an primären Mikrogliazellen, die unter Glucose-Sauerstoff-Entzug (OGD) dem *in vivo* Modell angepasst wurden.

Wir konnten zeigen, dass Gehirne von PI3K $\gamma$  *knockout* Mäusen nach MCAO ein deutlich größeres Infarktvolumen, als Wildtyp und PI3K $\gamma$  *knockin* aufwiesen. Eine Erklärung für die Expansion des Schlaganfalls stellte die verminderte Phagozytosefähigkeit der PI3K $\gamma$  *knockout* Zellen dar (Schmidt et al., 2013). *In vitro* Experimente nach Sauerstoff-Glucose-Entzug bestätigten, dass PI3K $\gamma$  *knockout* Mikroglia deutlich weniger *E. coli*-Partikel phagozytieren, als Wildtyp und PI3K $\gamma$  *knockin*. Phagozytotische Prozesse von Mikrogliazellen werden PI3K $\gamma$  Lipidkinase-unabhängig über die Regulation des cAMP-Spiegels kontrolliert (Schmidt et al., 2013). Ähnliche Effekte zeigten sich im MCAO-Modell. Messungen zum cAMP-Niveau nach OGD bestätigten diese Annahme. Korrelierend zur Phagozytoseaktivität *in vitro* nach LPS-Stimulation und im SAE-Modell wiesen PI3K $\gamma$  *knockout* Mikroglia hohe Konzentrationen des *second messengers* auf. Im Wildtyp und PI3K $\gamma$  *knockin* hingegen, zeigte sich ein geringes cAMP-Niveau nach OGD (Schmidt et al. 2015a). Da beide Genotypen keine Unterschiede im Infarktvolumen zeigten, konnten wir bestätigen, dass es sich um den Lipidkinase-unabhängigen Mechanismus des Signalproteins handeln muss. Unsere Daten belegen, dass PI3K $\gamma$  die Phagozytose und MMP9-Aktivität mikroglialer Zellen im MCAO-Modell über den cAMP-Spiegel reguliert. Infolgedessen wird die Ausbreitung des Infarkts inhibiert (Schmidt et al., 2015a)(Abb. 9.).

Fukunaga et al. beschrieben bereits einen neuroprotektiven Effekt im ischämischen Gehirn nach Akt-Aktivierung und identifizierten Akt als potenzielles Ziel therapeutischer Ansätze in hippocampalen Neuronen (Fukunaga and Kawano, 2003). Verbunden mit unseren Daten deutet sich an, dass sowohl Lipidkinase-abhängige Mechanismen über die Generierung von PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> und Akt-Phosphorylierung, als auch Lipidkinase-unabhängige Prozesse involviert sein könnten (Abb. 9). Hippocampale Neuronen, welche nach Ischämie in nekrotisch-apoptotische Zustände übergehen, scheinen protektive und anti-apoptotische Eigenschaften mittels Akt-Phosphorylierung, also Lipidkinase-abhängig zu initiieren (Fukunaga and Kawano, 2003). Die mögliche Verknüpfung des klassischen und alternativen PI3K-Signalweges nach akuter Ischämie ist in Abbildung 9 aufgeführt.

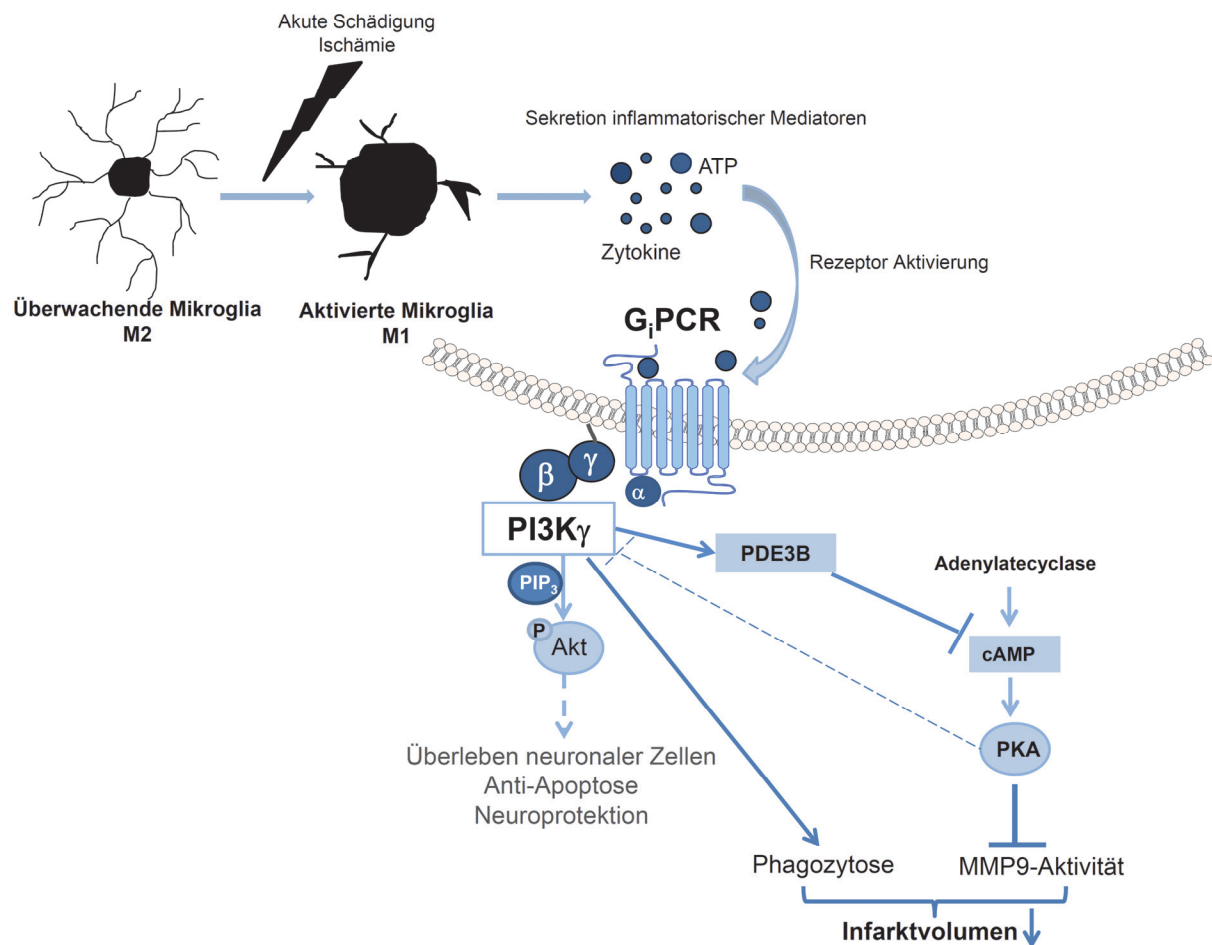
Bereits 2010 wurde die Beteiligung von PI3K $\gamma$  in der Ausbreitung des Infarkts nach MCAO näher untersucht. Studien von Jin et al. zeigten, dass das

Infarktvolume in PI3K $\gamma$ -defizienten Mäusen kontrovers zu unseren Daten deutlich geringer ist (Jin et al., 2010). Sie zeigten, dass Mikrogliazellen normaler und ischämischer Gehirne PI3K $\gamma$  unterschiedlich exprimieren. Es deutete sich an, dass möglicherweise PI3K $\gamma$  den Aktivierungsstatus innerhalb des Schlaganfall-Modells reguliert. Eine Hyperaktivierung mikroglialer Zellen gilt dabei als Hauptursache zur Störung der BBB-Integrität und nimmt eine übergeordnete Rolle während der Pathogenese des Schlaganfalls ein (Stoll and Jander, 1999, Jin et al., 2011). Inhibition der Mikrogliaaktivierung könnte BBB-Störungen reduzieren und damit eine schützende Funktion nach Ischämie und Schlaganfall ausüben (Kawabori and Yenari, 2014).

Jin et al. beschreiben die Inhibition von PI3K $\gamma$  in Mikrogliazellen als möglichen Therapieansatz nach Schlaganfall. Dabei soll eine Hyperaktivierung der Mikroglia mittels PI3K $\gamma$ -Inhibition *in vivo* vermieden werden, um die Sekretion inflammatorischer, gewebeschädigender Zytokine (TNF- $\alpha$ ) zu blockieren (Jin et al., 2010).

Kontrovers zu den Resultaten von Jin et al., zeigt PI3K $\gamma$  in unserem Modell eine protektive Funktion und führt nicht zur Hyperaktivierung der Mikroglia (Schmidt et al., 2015a). Wie bereits beschrieben, kontrollieren aktivierte Mikrogliazellen die Homeostase der BBB während septischer Enzephalopathie PI3K $\gamma$ -abhängig und regulieren über das cAMP-Niveau die MMP-Aktivität (Frister et al., 2014). In Verbindung mit diesen Ergebnissen zeigte sich erneut, dass PI3K $\gamma$  Lipidkinase-unabhängig über ihre Gerüstfunktion Mikroglia-Prozesse steuert und als therapeutischer Ansatz während neurodegenerativer Erkrankungen angesehen werden kann.





**Abbildung 9 - Inflammatorischer Signalweg nach akuter Hirnschädigung durch Sauerstoff-Glucose-Entzug**

Akute Schädigung des ZNS durch Ischämie (Sauerstoff-Glucose-Entzug) induziert die Aktivierung mikroglialer Zellen vom M2-Stadium zum M1- (aktivierten, inflammatorischen) Stadium. Dies führt zur Sekretion inflammatorischer Mediatoren (Zytokine, ROS und ATP), resultiert in BBB-Schädigung und dem Absterben neuronaler Strukturen. Durch geschädigte Neuronen sekretiertes ATP fungiert als Ligand, aktiviert den G<sub>i</sub>-gekoppelten Rezeptor und nachgeschaltet PI3K<sub>γ</sub>. Die Lipidkinase-abhängige Funktion des Signalproteins führt zur Bildung von PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, welches Akt aktiviert und anti-Apoptose-Vorgänge und neuroprotektive Mechanismen initiiert (Fukunaga et al., 2003). Parallel zur Lipidkinase-abhängigen Funktion spielt auch die Gerüstfunktion (*scaffold function*) von PI3K<sub>γ</sub> eine übergeordnete Rolle. Die Aktivierung des G<sub>i</sub>PCR induziert die Interaktion von PI3K<sub>γ</sub> mit PDE3B und der damit verbundenen Degradation von cAMP. Die Reduktion des cAMP-Spiegels hat zur Folge, dass phagozytotische Vorgänge innerhalb der Infarktregion ablaufen können und die Aktivität BBB-schädigender MMP deutlich inhibiert wird. PI3K<sub>γ</sub> kontrolliert Lipidkinase-abhängig und -unabhängig inflammatorische Funktionen mikroglialer Zellen nach akuter Ischämie.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

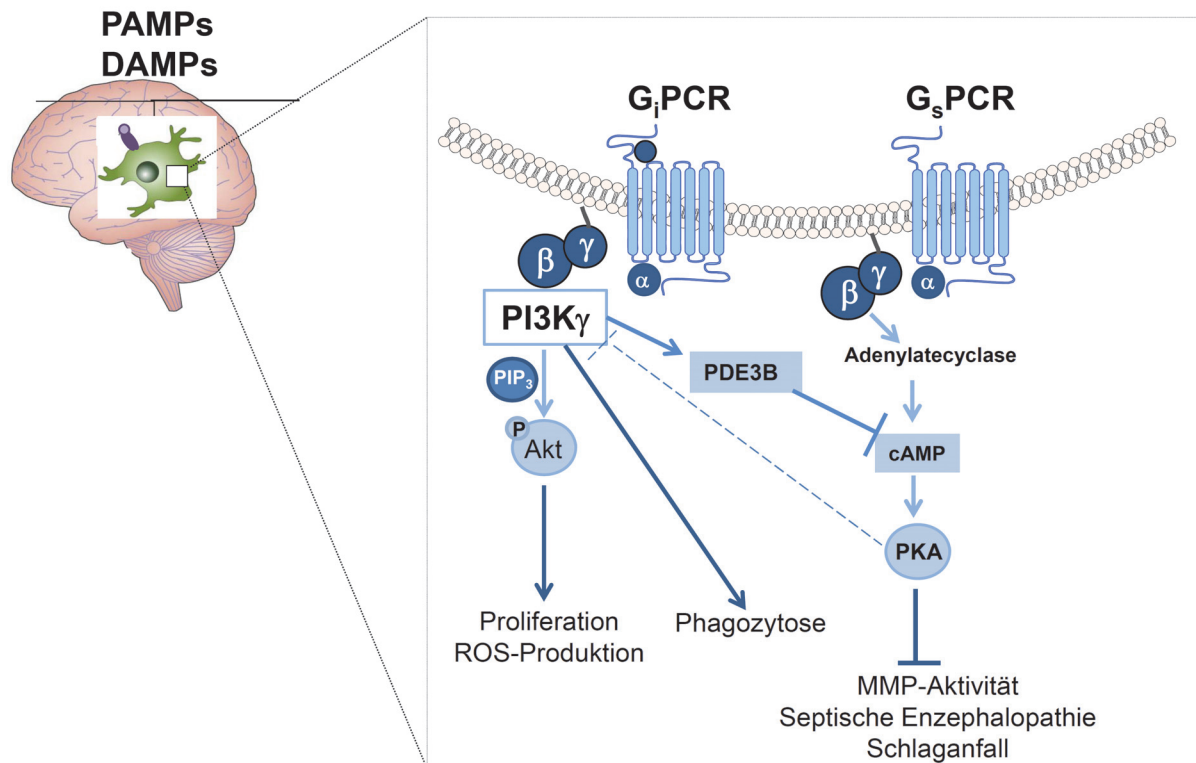
In dieser Dissertation wurde gezeigt, dass PI3K $\gamma$  Lipidkinase-abhängig und -unabhängig Mikrogliafunktionen steuert. PAMPs und DAMPs führen dabei zur Erhöhung der Expression von PI3K $\gamma$  und zur Induktion immunologischer Funktionen:

Die Phagozytose primärer Mikrogliazellen wird unabhängig der Kinaseaktivität von PI3K $\gamma$  über den cAMP-Spiegel reguliert. Das Signalprotein übt dabei über Interaktion mit PDE3B eine Gerüstfunktion aus, induziert die Hydrolyse von cAMP und steigert so die Phagozytoseaktivität (Schmidt et al., 2013).

Extrazelluläre Stimulation von Mikrogliazellen mit PAMPs (LPS) und DAMPs (ATP) induziert die Produktion von ROS in Wildtyp Mikroglia. Abhängig von der PI3K $\gamma$  Lipidkinaseaktivität wird die ROS-Bildung hormetisch gesteuert. ROS fungiert als Botenstoff zur Regulation der Proliferation. Hormetische Konzentrationen von ROS führen zur Erhöhung der Vitalität und Proliferationsrate in Wildtyp Mikroglia. Vergleichende Studien mit PI3K $\gamma$  *knockout* und PI3K $\gamma$  *knockin* Mikroglia zeigten einen identischen Phänotyp und identifizierten PI3K $\gamma$ -Lipidkinase-abhängige Prozesse und ROS als Mediator der Proliferation (Schmidt et al., 2014)(Schmidt et al., 2015b, manuscript in process).

Im Krankheitsmodell der septischen Enzephalopathy zeigten wir die PI3K $\gamma$  Lipidkinase-unabhängige Regulation der MMP9-Aktivität. PI3K $\gamma$  führt über Modulation des cAMP-Niveaus zur Reduktion von MMP9 und damit zu verbesserter BBB-Integrität. Nach Schlaganfall oder Trauma zeigte sich, dass die Inhibition des Signalproteins zu einer starken Ausbreitung des Infarkts führt. In diesem Modell konnten wir für das Signalprotein in Zellen des ZNS eine protektive Wirkung nachweisen (Frister et al., 2014)(Schmidt et al., 2015a).

Die Identifizierung von PI3K $\gamma$  als Mediator essentieller Mikrogliafunktionen, lässt vermuten, dass das Signalprotein als "Schalter" fungieren kann. Möglicherweise könnten protektive und degenerative Eigenschaften der Mikroglia mittels PI3K $\gamma$ -Aktivierung kontrolliert werden. Dosisabhängige Behandlung mit pharmakologischen Agenzien würde innerhalb neurodegenerativer Defekte anti- oder proinflammatorische Eigenschaften der Mikroglia induzieren. In weiterführenden Experimenten an Mikrogliazellen aus Wildtyp, PI3K $\gamma$  *knockout* und PI3K $\gamma$  *knockin* könnten die differenziellen Aktivierungsstadien untersucht werden. Die Unterscheidung zwischen basal-aktivierten, protektiven und degenerativen Mikroglia ist von großer klinischer Bedeutung.



**Abbildung 10 - PI3K $\gamma$  steuert Lipidkinase-abhängig und -unabhängig Mikrogliafunktionen**

Die Schädigung des ZNS durch Inflammation (PAMPs) oder Trauma (DAMPs) induziert die Aktivierung von Mikrogliazellen. PAMPs und DAMPs induzieren eine Erhöhung der PI3K $\gamma$ -Expression. Diese verstärkte Lipidkinaseaktivität von PI3K $\gamma$ , die Bildung von PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> und Akt-Phosphorylierung führen zur Erhöhung von ROS. ROS fungiert in hormetischen Dosen als Mediator der Proliferation. Zudem initiieren PAMPs die Aktivierung des G<sub>i</sub>-gekoppelten Rezeptors und damit die Interaktion von PI3K $\gamma$  mit PDE3B. Infolgedessen wird cAMP degradiert. Abhängig vom cAMP-Niveau wird die Phagozytose nach Inflammation oder Ischämie induziert und PKA blockiert. Weiterhin kontrolliert die Lipidkinase-unabhängige Funktion von PI3K $\gamma$  die Sekretion von Matrixmetalloproteasen im Krankheitsbild der septischen Enzephalopathie (3).

## 6 Literaturverzeichnis

- Abid MR, Kachra Z, Spokes KC, Aird WC (2000) NADPH oxidase activity is required for endothelial cell proliferation and migration. *FEBS letters* 486:252-256.
- Alcazar I, Marques M, Kumar A, Hirsch E, Wymann M, Carrera AC, Barber DF (2007) Phosphoinositide 3-kinase gamma participates in T cell receptor-induced T cell activation. *The Journal of experimental medicine* 204:2977-2987.
- Aloisi F (2001) Immune function of microglia. *Glia* 36:165-179.
- Araki N, Johnson MT, Swanson JA (1996) A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *The Journal of cell biology* 135:1249-1260.
- Baragli A, Ghe C, Arnoletti E, Granata R, Ghigo E, Muccioli G (2011) Acylated and unacylated ghrelin attenuate isoproterenol-induced lipolysis in isolated rat visceral adipocytes through activation of phosphoinositide 3-kinase gamma and phosphodiesterase 3B. *Biochimica et biophysica acta* 1811:386-396.
- Berod L, Heinemann C, Heink S, Escher A, Stadelmann C, Drube S, Wetzker R, Norgauer J, Kamradt T (2011) PI3Kgamma deficiency delays the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis and ameliorates its clinical outcome. *European journal of immunology* 41:833-844.
- Bessis A, Bechade C, Bernard D, Roumier A (2007) Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55:233-238.
- Bi L, Okabe I, Bernard DJ, Nussbaum RL (2002) Early embryonic lethality in mice deficient in the p110beta catalytic subunit of PI 3-kinase. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 13:169-172.
- Bi L, Okabe I, Bernard DJ, Wynshaw-Boris A, Nussbaum RL (1999) Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* 274:10963-10968.
- Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke HW (2007) Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. *Trends in neurosciences* 30:596-602.
- Block ML, Zecca L, Hong JS (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8:57-69.
- Boche D, Perry VH, Nicoll JA (2013) Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and applied neurobiology* 39:3-18.
- Bondev A, Rubio I, Wetzker R (1999) Differential regulation of lipid and protein kinase activities of phosphoinositide 3-kinase gamma in vitro. *Biological chemistry* 380:1337-1340.
- Bondeva T, Pirola L, Bulgarelli-Leva G, Rubio I, Wetzker R, Wymann MP (1998) Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kgamma to the protein kinases PKB and MAPK. *Science (New York, NY)* 282:293-296.
- Brown GC (2007) Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase. *Biochemical Society transactions* 35:1119-1121.
- Brown GC, Neher JJ (2010) Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Molecular neurobiology* 41:242-247.
- Brown GC, Neher JJ (2012) Eaten alive! Cell death by primary phagocytosis: 'phagoptosis'. *Trends Biochem Sci* 37:325-332.
- Calabrese EJ, Bachmann KA, Bailer AJ, Bolger PM, Borak J, Cai L, Cedergreen N, Cherian MG, Chiueh CC, Clarkson TW, Cook RR, Diamond DM, Doolittle DJ,

- Dorato MA, Duke SO, Feinendegen L, Gardner DE, Hart RW, Hastings KL, Hayes AW, Hoffmann GR, Ives JA, Jaworowski Z, Johnson TE, Jonas WB, Kaminski NE, Keller JG, Klaunig JE, Knudsen TB, Kozumbo WJ, Lettieri T, Liu SZ, Maisseu A, Maynard KI, Masoro EJ, McClellan RO, Mehendale HM, Mothersill C, Newlin DB, Nigg HN, Oehme FW, Phalen RF, Philbert MA, Rattan SI, Riviere JE, Rodricks J, Sapolsky RM, Scott BR, Seymour C, Sinclair DA, Smith-Sonneborn J, Snow ET, Spear L, Stevenson DE, Thomas Y, Tubiana M, Williams GM, Mattson MP (2007) Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicology and applied pharmacology* 222:122-128.
- Camps M, Ruckle T, Ji H, Ardisson V, Rintelen F, Shaw J, Ferrandi C, Chabert C, Gillieron C, Francon B, Martin T, Gretener D, Perrin D, Leroy D, Vitte PA, Hirsch E, Wymann MP, Cirillo R, Schwarz MK, Rommel C (2005) Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nature medicine* 11:936-943.
- Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S (1991) Oncogenes and signal transduction. *Cell* 64:281-302.
- Cantrell DA (2001) Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *Journal of cell science* 114:1439-1445.
- Catalin B, Cupido A, Iancau M, Albu CV, Kirchhoff F (2013) Microglia: first responders in the central nervous system. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie* 54:467-472.
- Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P (2007) The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain research reviews* 53:344-354.
- Coelho CM, Leever SJ (2000) Do growth and cell division rates determine cell size in multicellular organisms? *Journal of cell science* 113 ( Pt 17):2927-2934.
- Colton CA, Gilbert DL (1987) Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS letters* 223:284-288.
- Corraliza I (2014) Recruiting specialized macrophages across the borders to restore brain functions. *Frontiers in cellular neuroscience* 8:262.
- Czeh M, Gressens P, Kaindl AM (2011) The yin and yang of microglia. *Developmental neuroscience* 33:199-209.
- Dando SJ, Mackay-Sim A, Norton R, Currie BJ, St John JA, Ekberg JA, Batzloff M, Ulett GC, Beacham IR (2014) Pathogens Penetrating the Central Nervous System: Infection Pathways and the Cellular and Molecular Mechanisms of Invasion. *Clinical microbiology reviews* 27:691-726.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature neuroscience* 8:752-758.
- Davies KJ (1999) The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB life* 48:41-47.
- Degerman E, Ahmad F, Chung YW, Guirguis E, Omar B, Stenson L, Manganiello V (2011) From PDE3B to the regulation of energy homeostasis. *Current opinion in pharmacology* 11:676-682.
- Eggen BJ, Raj D, Hanisch UK, Boddeke HW (2013) Microglial phenotype and adaptation. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 8:807-823.

- Fellner L, Irschick R, Schanda K, Reindl M, Klimaschewski L, Poewe W, Wenning GK, Stefanova N (2013) Toll-like receptor 4 is required for alpha-synuclein dependent activation of microglia and astroglia. *Glia* 61:349-360.
- Ferguson GJ, Milne L, Kulkarni S, Sasaki T, Walker S, Andrews S, Crabbe T, Finan P, Jones G, Jackson S, Camps M, Rommel C, Wymann M, Hirsch E, Hawkins P, Stephens L (2007) PI(3)Kgamma has an important context-dependent role in neutrophil chemokinesis. *Nature cell biology* 9:86-91.
- Fernandes A, Miller-Fleming L, Pais TF (2014) Microglia and inflammation: conspiracy, controversy or control? *Cellular and molecular life sciences : CMLS*.
- Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R (2007) Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* 447:972-978.
- Freilich RW, Woodbury ME, Ikezu T (2013) Integrated expression profiles of mRNA and miRNA in polarized primary murine microglia. *PloS one* 8:e79416.
- Frister A, Schmidt C, Schneble N, Brodhun M, Gonnert FA, Bauer M, Hirsch E, Muller JP, Wetzker R, Bauer R (2014) Phosphoinositide 3-Kinase gamma Affects LPS-Induced Disturbance of Blood-Brain Barrier Via Lipid Kinase-Independent Control of cAMP in Microglial Cells. *Neuromolecular medicine*.
- Fukunaga K, Kawano T (2003) Akt is a molecular target for signal transduction therapy in brain ischemic insult. *Journal of pharmacological sciences* 92:317-327.
- Gao HM, Jiang J, Wilson B, Zhang W, Hong JS, Liu B (2002) Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 81:1285-1297.
- Garden GA, Möller T (2006) Microglia biology in health and disease. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 1:127-137.
- Gertig U, Hanisch UK (2014) Microglial diversity by responses and responders. *Frontiers in cellular neuroscience* 8:101.
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science (New York, NY)* 330:841-845.
- Giunti D, Parodi B, Cordano C, Uccelli A, Kerlero de Rosbo N (2014) Can we switch microglia's phenotype to foster neuroprotection? Focus on multiple sclerosis. *Immunology* 141:328-339.
- Gomez-Nicola D, Perry VH (2014) Microglial Dynamics and Role in the Healthy and Diseased Brain: A Paradigm of Functional Plasticity. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*.
- Gruen M, Rose C, König C, Gajda M, Wetzker R, Brauer R (2010) Loss of phosphoinositide 3-kinase gamma decreases migration and activation of phagocytes but not T cell activation in antigen-induced arthritis. *BMC musculoskeletal disorders* 11:63.
- Guo D, Kassiri Z, Basu R, Chow FL, Kandam V, Damilano F, Liang W, Izumo S, Hirsch E, Penninger JM, Backx PH, Oudit GY (2010) Loss of PI3Kgamma enhances cAMP-dependent MMP remodeling of the myocardial N-cadherin adhesion complexes and extracellular matrix in response to early biomechanical stress. *Circulation research* 107:1275-1289.
- Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature neuroscience* 10:1387-1394.

- Hawkins PT, Anderson KE, Davidson K, Stephens LR (2006) Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochemical Society transactions* 34:647-662.
- Heinloth A, Heermeier K, Raff U, Wanner C, Galle J (2000) Stimulation of NADPH oxidase by oxidized low-density lipoprotein induces proliferation of human vascular endothelial cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 11:1819-1825.
- Heneka MT, Kummer MP, Latz E (2014) Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature reviews Immunology* 14:463-477.
- Hetier E, Ayala J, Deneffe P, Bousseau A, Rouget P, Mallat M, Prochiantz A (1988) Brain macrophages synthesize interleukin-1 and interleukin-1 mRNAs in vitro. *Journal of neuroscience research* 21:391-397.
- Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, Silengo L, Sozzani S, Mantovani A, Altruda F, Wymann MP (2000) Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science (New York, NY)* 287:1049-1053.
- Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, Imai Y, Nakamura Y, Inoue K, Kohsaka S (2001) Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:1975-1982.
- Hu F, Ku MC, Markovic D, OD AD, Lehnardt S, Synowitz M, Wolf SA, Kettenmann H (2014) Glioma-associated microglial MMP9 expression is upregulated by TLR2 signaling and sensitive to minocycline. *International journal of cancer Journal international du cancer* 135:2569-2578.
- Inoue K (2006) The function of microglia through purinergic receptors: neuropathic pain and cytokine release. *Pharmacology & therapeutics* 109:210-226.
- Jack CS, Arbour N, Manusow J, Montgrain V, Blain M, McCrea E, Shapiro A, Antel JP (2005) TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 175:4320-4330.
- Jin R, Song Z, Yu S, Piazza A, Nanda A, Penninger JM, Granger DN, Li G (2011) Phosphatidylinositol-3-kinase gamma plays a central role in blood-brain barrier dysfunction in acute experimental stroke. *Stroke* 42:2033-2044.
- Jin R, Yu S, Song Z, Quillin JW, Deasis DP, Penninger JM, Nanda A, Granger DN, Li G (2010) Phosphoinositide 3-kinase-gamma expression is upregulated in brain microglia and contributes to ischemia-induced microglial activation in acute experimental stroke. *Biochemical and biophysical research communications* 399:458-464.
- Kaneko YS, Nakashima A, Mori K, Nagatsu T, Nagatsu I, Ota A (2009) Lipopolysaccharide extends the lifespan of mouse primary-cultured microglia. *Brain Res* 1279:9-20.
- Kaneko YS, Ota A, Nakashima A, Mori K, Nagatsu I, Nagatsu T (2012) Regulation of oxidative stress in long-lived lipopolysaccharide-activated microglia. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 39:599-607.
- Katsumoto A, Lu H, Miranda AS, Ransohoff RM (2014) Ontogeny and Functions of Central Nervous System Macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 193:2615-2621.
- Kaur C, Dheen ST, Ling EA (2007) From blood to brain: amoeboid microglial cell, a nascent macrophage and its functions in developing brain. *Acta pharmacologica Sinica* 28:1087-1096.
- Kaur C, Hao AJ, Wu CH, Ling EA (2001) Origin of microglia. *Microscopy research and technique* 54:2-9.



- Kawabori M, Yenari MA (2014) The role of the microglia in acute CNS injury. *Metabolic brain disease*.
- Kettenmann H, Banati R, Walz W (1993) Electrophysiological behavior of microglia. *Glia* 7:93-101.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. *Physiological reviews* 91:461-553.
- Kierdorf K, Prinz M (2013) Factors regulating microglia activation. *Frontiers in cellular neuroscience* 7:44.
- Kigerl KA, de Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, Popovich PG, Keane RW (2014) Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Experimental neurology* 258:5-16.
- Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, Joshi BV, Jacobson KA, Kohsaka S, Inoue K (2007) UDP acting at P2Y<sub>6</sub> receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 446:1091-1095.
- König C, Gavrilova-Ruch O, von Banchet GS, Bauer R, Grun M, Hirsch E, Rubio I, Schulz S, Heinemann SH, Schaible HG, Wetzker R (2010) Modulation of mu opioid receptor desensitization in peripheral sensory neurons by phosphoinositide 3-kinase gamma. *Neuroscience* 169:449-454.
- Könnecke H, Bechmann I (2013) The role of microglia and matrix metalloproteinases involvement in neuroinflammation and gliomas. *Clinical & developmental immunology* 2013:914104.
- Laffargue M, Calvez R, Finan P, Trifilieff A, Barbier M, Altruda F, Hirsch E, Wymann MP (2002) Phosphoinositide 3-kinase gamma is an essential amplifier of mast cell function. *Immunity* 16:441-451.
- Lambert C, Ase AR, Seguela P, Antel JP (2010) Distinct migratory and cytokine responses of human microglia and macrophages to ATP. *Brain, behavior, and immunity* 24:1241-1248.
- Lauber K, Bohn E, Krober SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, Zobywalski A, Baksh S, Xu Y, Autenrieth IB, Schulze-Osthoff K, Belka C, Stuhler G, Wesselborg S (2003) Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 113:717-730.
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39:151-170.
- Lee DK, Park EJ, Kim EK, Jin J, Kim JS, Shin IJ, Kim BY, Lee H, Kim DE (2012) Atorvastatin and simvastatin, but not pravastatin, up-regulate LPS-induced MMP-9 expression in macrophages by regulating phosphorylation of ERK and CREB. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 30:499-511.
- Lee JS, Nauseef WM, Moeenrezakhanlou A, Sly LM, Noubir S, Leidal KG, Schlomann JM, Krystal G, Reiner NE (2007) Monocyte p110alpha phosphatidylinositol 3-kinase regulates phagocytosis, the phagocyte oxidase, and cytokine production. *Journal of leukocyte biology* 81:1548-1561.
- Lehmann K, Muller JP, Schlott B, Skroblin P, Barz D, Norgauer J, Wetzker R (2009) PI3Kgamma controls oxidative bursts in neutrophils via interactions with PKCalpha and p47phox. *The Biochemical journal* 419:603-610.
- Lehnardt S, Lehmann S, Kaul D, Tschimmel K, Hoffmann O, Cho S, Krueger C, Nitsch R, Meisel A, Weber JR (2007) Toll-like receptor 2 mediates CNS injury in focal cerebral ischemia. *Journal of neuroimmunology* 190:28-33.

- Leverrier Y, Okkenhaug K, Sawyer C, Bilancio A, Vanhaesebroeck B, Ridley AJ (2003) Class I phosphoinositide 3-kinase p110beta is required for apoptotic cell and Fcgamma receptor-mediated phagocytosis by macrophages. *The Journal of biological chemistry* 278:38437-38442.
- Ling EA, Wong WC (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7:9-18.
- Liu B, Gao HM, Wang JY, Jeohn GH, Cooper CL, Hong JS (2002) Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences* 962:318-331.
- Madishetti S, Schneble N, Konig C, Hirsch E, Schulz S, Muller JP, Wetzker R (2014) PI3Kgamma integrates cAMP and Akt signalling of the mu-opioid receptor. *British journal of pharmacology* 171:3328-3337.
- Maezawa I, Zimin PI, Wulff H, Jin LW (2011) Amyloid-beta protein oligomer at low nanomolar concentrations activates microglia and induces microglial neurotoxicity. *The Journal of biological chemistry* 286:3693-3706.
- Makranz C, Cohen G, Reichert F, Kodama T, Rotshenker S (2006) cAMP cascade (PKA, Epac, adenylyl cyclase, Gi, and phosphodiesterases) regulates myelin phagocytosis mediated by complement receptor-3 and scavenger receptor-AI/II in microglia and macrophages. *Glia* 53:441-448.
- Mander PK, Jekabsone A, Brown GC (2006) Microglia proliferation is regulated by hydrogen peroxide from NADPH oxidase. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 176:1046-1052.
- Martinez FO, Helming L, Gordon S (2009) Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual review of immunology* 27:451-483.
- McTigue DM, Tripathi RB (2008) The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *Journal of neurochemistry* 107:1-19.
- Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L, Jr., Baron P, Villalba M, Ferrari D, Rossi F (1995) Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* 374:647-650.
- Medzhitov R, Schneider DS, Soares MP (2012) Disease tolerance as a defense strategy. *Science (New York, NY)* 335:936-941.
- Michels M, Danielski LG, Dal-Pizzol F, Petronilho F (2014) Neuroinflammation: microglial activation during sepsis. *Current neurovascular research* 11:262-270.
- Moss DW, Bates TE (2001) Activation of murine microglial cell lines by lipopolysaccharide and interferon-gamma causes NO-mediated decreases in mitochondrial and cellular function. *The European journal of neuroscience* 13:529-538.
- Naccache PH, Levasseur S, Lachance G, Chakravarti S, Bourgoin SG, McColl SR (2000) Stimulation of human neutrophils by chemotactic factors is associated with the activation of phosphatidylinositol 3-kinase gamma. *The Journal of biological chemistry* 275:23636-23641.
- Nakajima K, Kohsaka S (2001) Microglia: activation and their significance in the central nervous system. *Journal of biochemistry* 130:169-175.
- Nakamura Y, Si QS, Kataoka K (1999) Lipopolysaccharide-induced microglial activation in culture: temporal profiles of morphological change and release of cytokines and nitric oxide. *Neuroscience research* 35:95-100.
- Narantuya D, Nagai A, Sheikh AM, Wakabayashi K, Shiota Y, Watanabe T, Masuda J, Kobayashi S, Kim SU, Yamaguchi S (2010) Microglia transplantation attenuates white matter injury in rat chronic ischemia model via matrix metalloproteinase-2 inhibition. *Brain research* 1316:145-152.

- Navascues J, Calvente R, Marin-Teva JL, Cuadros MA (2000) Entry, dispersion and differentiation of microglia in the developing central nervous system. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 72:91-102.
- Nayak D, Roth TL, McGavern DB (2014) Microglia development and function. *Annual review of immunology* 32:367-402.
- Neher JJ, Neniskyte U, Brown GC (2012) Primary phagocytosis of neurons by inflamed microglia: potential roles in neurodegeneration. *Front Pharmacol* 3.
- Neher JJ, Neniskyte U, Zhao JW, Bal-Price A, Tolkovsky AM, Brown GC (2011) Inhibition of microglial phagocytosis is sufficient to prevent inflammatory neuronal death. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 186:4973-4983.
- Neumann H, Kotter MR, Franklin RJ (2009) Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain : a journal of neurology* 132:288-295.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (New York, NY)* 308:1314-1318.
- Okkenhaug K (2013) Signaling by the phosphoinositide 3-kinase family in immune cells. *Annual review of immunology* 31:675-704.
- Olah M, Biber K, Vinet J, Boddeke HW (2011) Microglia phenotype diversity. *CNS & neurological disorders drug targets* 10:108-118.
- Paez J, Sellers WR (2003) PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling. *Cancer treatment and research* 115:145-167.
- Pais TF, Figueiredo C, Peixoto R, Braz MH, Chatterjee S (2008) Necrotic neurons enhance microglial neurotoxicity through induction of glutaminase by a MyD88-dependent pathway. *Journal of neuroinflammation* 5:43.
- Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D, Gross CT (2011) Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science (New York, NY)* 333:1456-1458.
- Parker LC, Prince LR, Sabroe I (2007) Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. *Clinical and experimental immunology* 147:199-207.
- Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, 3rd, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR, Gan WB (2013) Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 155:1596-1609.
- Passos GF, Figueiredo CP, Prediger RD, Silva KA, Siqueira JM, Duarte FS, Leal PC, Medeiros R, Calixto JB (2010) Involvement of phosphoinositide 3-kinase gamma in the neuro-inflammatory response and cognitive impairments induced by beta-amyloid 1-40 peptide in mice. *Brain, behavior, and immunity* 24:493-501.
- Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, Marengo S, Russo G, Azzolino O, Rybalkin SD, Silengo L, Altruda F, Wetzker R, Wymann MP, Lembo G, Hirsch E (2004) PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* 118:375-387.
- Perino A, Ghigo A, Ferrero E, Morello F, Santulli G, Baillie GS, Damilano F, Dunlop AJ, Pawson C, Walser R, Levi R, Altruda F, Silengo L, Langeberg LK, Neubauer G, Heymans S, Lembo G, Wymann MP, Wetzker R, Houslay MD, Iaccarino G, Scott JD, Hirsch E (2011) Integrating cardiac PIP3 and cAMP signaling through a PKA anchoring function of p110gamma. *Molecular cell* 42:84-95.

- Peters DG, Connor JR (2014) Introduction to cells comprising the nervous system. *Advances in neurobiology* 9:33-45.
- Ponomarev ED, Maresz K, Tan Y, Dittel BN (2007) CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:10714-10721.
- Qin L, Li G, Qian X, Liu Y, Wu X, Liu B, Hong JS, Block ML (2005) Interactive role of the toll-like receptor 4 and reactive oxygen species in LPS-induced microglia activation. *Glia* 52:78-84.
- Ransohoff RM, Perry VH (2009) Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annual review of immunology* 27:119-145.
- Ribes S, Ebert S, Czesnik D, Regen T, Zeug A, Bukowski S, Mildner A, Eiffert H, Hanisch UK, Hammerschmidt S, Nau R (2009) Toll-like receptor prestimulation increases phagocytosis of *Escherichia coli* DH5alpha and *Escherichia coli* K1 strains by murine microglial cells. *Infection and immunity* 77:557-564.
- Ristow M, Schmeisser S (2011) Extending life span by increasing oxidative stress. *Free radical biology & medicine* 51:327-336.
- Rivest S (2003) Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain, behavior, and immunity* 17:13-19.
- Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK (2004) Role of microglia in central nervous system infections. *Clinical microbiology reviews* 17:942-964, table of contents.
- Rommel C, Camps M, Ji H (2007) PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? *Nature reviews Immunology* 7:191-201.
- Rosenberg GA (2002) Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* 39:279-291.
- Roy R, Chauhan LK, Das M, Tripathi A, Dwivedi PD (2014) Phagocytic cells internalize ZnO particles by FcγRIII-receptor pathway. *Immunobiology* 219:746-755.
- Saijo K, Glass CK (2011) Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nature reviews Immunology* 11:775-787.
- Sasaki T, Irie-Sasaki J, Jones RG, Oliveira-dos-Santos AJ, Stanford WL, Bolon B, Wakeham A, Itie A, Bouchard D, Kozieradzki I, Joza N, Mak TW, Ohashi PS, Suzuki A, Penninger JM (2000) Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science (New York, NY)* 287:1040-1046.
- Schmidt C, Schneble N, Muller JP, Bauer R, Perino A, Marone R, Rybalkin SD, Wymann MP, Hirsch E, Wetzker R (2013) Phosphoinositide 3-kinase gamma mediates microglial phagocytosis via lipid kinase-independent control of cAMP. *Neuroscience* 233:44-53.
- Schmidt C, Schneble N, Wetzker R (2014) The fifth dimension of innate immunity. *Journal of cell communication and signaling*.
- Schreibelt G, Kooij G, Reijerkerk A, van Doorn R, Gringhuis SI, van der Pol S, Weksler BB, Romero IA, Couraud PO, Piontek J, Blasig IE, Dijkstra CD, Ronken E, de Vries HE (2007) Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21:3666-3676.
- Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SE, Pollard JW, Frampton J, Liu KJ, Geissmann F

- (2012) A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science (New York, NY)* 336:86-90.
- Seth P, Koul N (2008) Astrocyte, the star avatar: redefined. *Journal of biosciences* 33:405-421.
- Shimizu E, Kawahara K, Kajizono M, Sawada M, Nakayama H (2008) IL-4-induced selective clearance of oligomeric beta-amyloid peptide(1-42) by rat primary type 2 microglia. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 181:6503-6513.
- Spitzenberg V, Konig C, Ulm S, Marone R, Ropke L, Muller JP, Grun M, Bauer R, Rubio I, Wymann MP, Voigt A, Wetzker R (2010) Targeting PI3K in neuroblastoma. *Journal of cancer research and clinical oncology* 136:1881-1890.
- Stephens L, Hawkins P (2011) Signalling via class IA PI3Ks. *Advances in enzyme regulation* 51:27-36.
- Stephens LR, Eguinoa A, Erdjument-Bromage H, Lui M, Cooke F, Coadwell J, Smrcka AS, Thelen M, Cadwallader K, Tempst P, Hawkins PT (1997) The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* 89:105-114.
- Stoll G, Jander S (1999) The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Progress in neurobiology* 58:233-247.
- Stoyanov B, Volinia S, Hanck T, Rubio I, Loubtchenkov M, Malek D, Stoyanova S, Vanhaesebroeck B, Dhand R, Nurnberg B, et al. (1995) Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science (New York, NY)* 269:690-693.
- Streit WJ (2002) Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40:133-139.
- Streit WJ, Xue QS (2009) Life and death of microglia. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 4:371-379.
- Suire S, Condliffe AM, Ferguson GJ, Ellson CD, Guillou H, Davidson K, Welch H, Coadwell J, Turner M, Chilvers ER, Hawkins PT, Stephens L (2006) Gbetagammias and the Ras binding domain of p110gamma are both important regulators of PI(3)Kgamma signalling in neutrophils. *Nature cell biology* 8:1303-1309.
- Sumi N, Nishioku T, Takata F, Matsumoto J, Watanabe T, Shuto H, Yamauchi A, Dohgu S, Kataoka Y (2010) Lipopolysaccharide-activated microglia induce dysfunction of the blood-brain barrier in rat microvascular endothelial cells co-cultured with microglia. *Cellular and molecular neurobiology* 30:247-253.
- Sun HN, Kim SU, Lee MS, Kim SK, Kim JM, Yim M, Yu DY, Lee DS (2008) Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase-dependent activation of phosphoinositide 3-kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signal pathways is required for lipopolysaccharide-induced microglial phagocytosis. *Biological & pharmaceutical bulletin* 31:1711-1715.
- Swanson JA (2008) Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nature reviews Molecular cell biology* 9:639-649.
- Takeuchi H (2010) Neurotoxicity by microglia: mechanisms and potential therapeutic strategy. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 1:12-21.
- Tamura N, Hazeki K, Okazaki N, Kametani Y, Murakami H, Takaba Y, Ishikawa Y, Nigorikawa K, Hazeki O (2009) Specific role of phosphoinositide 3-kinase p110alpha in the regulation of phagocytosis and pinocytosis in macrophages. *The Biochemical journal* 423:99-108.

- Thomas WE (1992) Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain research Brain research reviews* 17:61-74.
- Town T, Nikolic V, Tan J (2005) The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses. *Journal of neuroinflammation* 2:24.
- Udan ML, Ajit D, Crouse NR, Nichols MR (2008) Toll-like receptors 2 and 4 mediate Abeta(1-42) activation of the innate immune response in a human monocytic cell line. *Journal of neurochemistry* 104:524-533.
- Vanhaesebroeck B, Rohn JL, Waterfield MD (2004) Gene targeting: attention to detail. *Cell* 118:274-276.
- Vilhardt F (2005) Microglia: phagocyte and glia cell. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37:17-21.
- Vogel DY, Vereyken EJ, Glim JE, Heijnen PD, Moeton M, van der Valk P, Amor S, Teunissen CE, van Horssen J, Dijkstra CD (2013) Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. *Journal of neuroinflammation* 10:35.
- Webb LM, Vigorito E, Wymann MP, Hirsch E, Turner M (2005) Cutting edge: T cell development requires the combined activities of the p110gamma and p110delta catalytic isoforms of phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 175:2783-2787.
- Webster NL, Crowe SM (2006) Matrix metalloproteinases, their production by monocytes and macrophages and their potential role in HIV-related diseases. *Journal of leukocyte biology* 80:1052-1066.
- Wetzker R, Rommel C (2004) Phosphoinositide 3-kinases as targets for therapeutic intervention. *Current pharmaceutical design* 10:1915-1922.
- Witting A, Muller P, Herrmann A, Kettenmann H, Nolte C (2000) Phagocytic clearance of apoptotic neurons by Microglia/Brain macrophages in vitro: involvement of lectin-, integrin-, and phosphatidylserine-mediated recognition. *Journal of neurochemistry* 75:1060-1070.
- Woo MS, Park JS, Choi IY, Kim WK, Kim HS (2008) Inhibition of MMP-3 or -9 suppresses lipopolysaccharide-induced expression of proinflammatory cytokines and iNOS in microglia. *Journal of neurochemistry* 106:770-780.
- Wymann MP, Bjorklof K, Calvez R, Finan P, Thomast M, Trifilieff A, Barbier M, Altruda F, Hirsch E, Laffargue M (2003) Phosphoinositide 3-kinase gamma: a key modulator in inflammation and allergy. *Biochemical Society transactions* 31:275-280.
- Wymann MP, Pirola L (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochimica et biophysica acta* 1436:127-150.
- Wymann MP, Solinas G (2013) Inhibition of phosphoinositide 3-kinase gamma attenuates inflammation, obesity, and cardiovascular risk factors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1280:44-47.
- Zhao W, Xie W, Xiao Q, Beers DR, Appel SH (2006) Protective effects of an anti-inflammatory cytokine, interleukin-4, on motoneuron toxicity induced by activated microglia. *Journal of neurochemistry* 99:1176-1187.
- Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M (2006) Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nature neuroscience* 9:268-275.

Zur Publikation eingereichte Manuskripte

Schmidt C, Frahm C, Schneble N, Müller JP, Brodhun M, Franco I, Witte OW, Hirsch E, Wetzker R, Bauer R. (2015a) **Phosphoinositide 3-kinase $\gamma$  restrains neurotoxic effects of microglia after transitory focal cerebral ischemia.** *Molecular Neurobiology*, 1 October 2015 accepted).

Schneble N, Schmidt C, Bauer R, Monajembashi S, Müller JP, Wetzker R. (2015) **Phosphoinositide 3-kinase $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) mediates microglial motility** (submitted)

Geplantes Manuskript zur Publikation, Ende 2015

Schmidt C, Schneble N, Müller JP, Zimmer RM, Bauer R, Wetzker R. (2015b) **Phosphoinositide 3-Kinase $\gamma$  and ROS as Hormetic Mediators of Microglial Proliferation** (manuscript in process, 2015)

Weitere Quellen:

- (1) Der Gesundheits-Brockhaus, F.A. Brockhaus GmbH, Leipzig – Mannheim
- (2) Bildquellen: Abraham *et al.*, 2010; Medical-labs.net; Wadsworth.org; Garden and Möller, 2006)
- (3) Zusammengefügte Abbildungen aus: Saijo *et al.*, 2011, Garden and Möller, 2006)



## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Wetzker für die Möglichkeit, meine Promotion am Institut für Molekulare Zellbiologie anfertigen zu können, für die Bereitstellung des interessanten Themas und die professionelle Betreuung. Ebenso bedanke ich mich für die Möglichkeit, während dieser Zeit an internationalen Kongressen, Workshops und Austauschprogrammen teilnehmen zu können. Ich konnte nicht nur interessante wissenschaftliche Erfahrungen, sondern auch faszinierende kulturelle Eindrücke sammeln.

Weiterhin möchte ich mich bei PD Dr. J. P. Müller für seine fachliche und methodische Unterstützung bedanken. Seine Hilfsbereitschaft, Vorschläge zu neuen experimentellen Ansätzen und die gewinnbringenden Diskussionen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Desweiteren danke ich Herrn Prof. Dr. R. Bauer für die Durchführung der Maus-Versuche und seine Bereitschaft, mir geduldig alle medizinischen Fragestellungen zu beantworten. Mein ganz besonderer Dank gilt Nadine Schneble, die nicht nur als Kollegin, sondern auch als Freundin in den letzten Jahren an meiner Seite stand. Danke für unsere gute Zusammenarbeit im Labor, Deine unermüdlichen Erklärungsversuche zu Signalwegen, die schöne Zeit auf Dienstreisen und auch Deinen Beistand bei privaten Sorgen. Herzlichen Dank auch an Ute Wittig für ihre fachliche Unterstützung im Laboralltag, ihre Hilfsbereitschaft und Fürsorge bei wissenschaftlichen und privaten Konflikten. Zudem möchte ich mich auch bei allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts bedanken, vor allem aber bei Rose, Manu, Heidi und Dorith. Ich danke weiterhin Anne H., Anne K., Govind, Martina und Adrian für die unzähligen wissenschaftlichen Diskussionen, ihre Hilfsbereitschaft und die gute Atmosphäre im Büro.

Der größte Dank gilt jedoch meinen Eltern. Danke, dass ihr immer hinter mir und meinen Entscheidungen steht, mich unterstützt und an mich glaubt. Danke auch dafür, dass ihr mir die Kraft gegeben habt, mich allen Herausforderungen zu stellen, um meine Ziele zu erreichen. Meinen Geschwistern Marvin und Lilly bin ich unendlich dankbar, für ihre unbeschwerte Sichtweise auf andere wichtige Dinge im Leben. Ich bin froh, dass es euch gibt! Danke Sebastian, dass Du immer für mich da bist, meine Launen erträgst und wir alle Höhen und Tiefen des Lebens gemeinsam meistern. Ich danke Dir, dass wir trotz schlimmer Schicksalsschläge zusammenhalten, füreinander da sind und Du mir die Zeit gelassen hast, diese Arbeit fertig zu stellen. Ich danke Cash, für alle geglückten Ablenkungsmanöver.

*IN MEMORIAM Ui Gärtner*

## Curriculum Vitae

### Angaben zur Person

Name, Vorname: Schmidt Caroline  
Geburtsdatum: 22.02.1983  
Geburtsort: Pößneck  
Staatsbürgerschaft: deutsch  
Familienstand: Ledig

### Werdegang

Schulbildung: 1989 – 1993 Grundschule Könitz  
1993 – 1995 Realschule Könitz  
1995 – 2002 Erasmus – Rheinhold - Gymnasium Saalfeld  
06/2002 Abitur  
2002 – 2004 Berufsbildungszentrum Völklingen/Saarland  
05/2004 Abschluss zur Biologielaborantin

Studium: 2005 – 2008 *Bachelor of Science* Biologie  
Universität Leipzig  
2008 – 2010 *Master of Science* Microbiology  
Friedrich – Schiller - Universität Jena

Promotion: ab 2012 zum Thema:  
**„Phosphoinositid 3-Kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) als Mediator  
inflammatorischer Funktionen in Mikrogliazellen“**  
Institut für Molekulare Zellbiologie, Universitätsklinikum Jena

Jena, Oktober 2015

## Publikationen und Kongressbeiträge

### Publikationen

#### 2013

**Schmidt C**, Schneble N, Müller JP, Bauer R, Perino A, Marone R, Rybalkin SD, Wymann MP, Hirsch E, Wetzker R (2013) **Phosphoinositide 3-kinase gamma mediates microglial phagocytosis via lipid kinase-independent control of cAMP**. *Neuroscience* 233:44-53.

**Schmidt C**, Schneble N, Bauer R, Wetzker R (2013) **Trägerische Etiketten für Signalproteine** Springer Verlag, BIOSpektrum 04June 2013, Volume 19, Issue 4, pp 401-404

#### 2014

Frister A, **Schmidt C**, Schneble N, Brodhun M, Gonnert FA, Bauer M, Hirsch E, Müller JP, Wetzker R, Bauer R (2014) **Phosphoinositide 3-Kinase gamma Affects LPS-Induced Disturbance of Blood-Brain Barrier Via Lipid Kinase-Independent Control of cAMP in Microglial Cells**. *Neuromolecular Medicine*. Dec; 16(4):704.-13

**Schmidt C**, Schneble N, Wetzker R (2014) **The fifth dimension of innate immunity**. *Journal of cell communication and signaling*. Dec;8(4):363-7.

#### 2015

**Schmidt C**, Frahm C, Schneble N, Müller JP, Brodhun M, Franco I, Witte OW, Hirsch E, Wetzker R, Bauer R (2015a) **Phosphoinositide 3-kinase $\gamma$  restrains neurotoxic effects of microglia after transitory focal cerebral ischemia**. *Molecular Neurobiology*, accepted 1 October 2015).

Schneble N, **Schmidt C**, Bauer R, Monajembashi S, Müller JP, Wetzker R (2015) **Phosphoinositide 3-kinase $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) mediates microglial motility** (submitted)

**Schmidt C**, Schneble N, Müller JP, Zimmer RM, Bauer R, Wetzker R (2015b) **Phosphoinositide 3-Kinase $\gamma$  and ROS as Hormetic Mediators of Microglial Proliferation** (Manuscript in process)

### Posterpräsentationen

Schmidt C, Schneble N, Rubio I, Müller JP, Bauer R, Wetzker R. **Phosphoinositide 3-Kinase $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) mediates inflammatory functions of microglia cells**. 10<sup>th</sup> European Meeting on Glial Cells in Health and Disease. Prag (2011).

Schmidt C, Schneble N, Wymann MP, Rubio I, Müller JP, Wetzker R. **Critical Role of Phosphoinositide 3-Kinase $\gamma$  in microglial phagocytosis**. International Conference on Membrane Dynamics. Basel (2012)

- Schmidt C, Schneble N, Müller JP, Wetzker R. **Hormetic Reaction Pattern of Microglia**. International Conference on Dose Response. Boston-USA (2013)
- Schmidt C, Schneble N, Müller JP, Bauer R, Perino A, Marone R, Rybalkin SD, Wymann MP, Hirsch E, Wetzker R. **Phosphoinositide 3-kinase mediates microglial phagocytosis via lipid kinase-independent control of cAMP**. European Conference on Glial Cells in Health and Disease. Berlin (2013)
- Schmidt C, Schneble N, Müller JP, Bauer R, Wetzker R. **Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) as mediator of microglial proliferation and production of reactive oxygen species (ROS)**. Summerschool on Cellular Stress Responses. Peking-China (2014) (Manuskript in Bearbeitung)
- Schmidt C, Schneble N, Müller JP, Bauer R, Perino A, Marone R, Rybalkin SD, Wymann MP, Hirsch E, Wetzker R. **Phosphoinositide 3-kinase mediates microglial phagocytosis via lipid kinase-independent control of cAMP**. European Conference on Glial Cells in Health and Disease. St. Odile-Frankreich (2014)

**Selbständigkeitserklärung**

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die den benutzten Quellen, wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen, wurden als diese kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner Prüfungsbehörde eingereicht.

Jena, Oktober 2015

Caroline Schmidt